



Bactéries associées à l'éponge Méditerranéenne Crambe crambe : diversité et possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques

Julie Croué

► To cite this version:

Julie Croué. Bactéries associées à l'éponge Méditerranéenne Crambe crambe : diversité et possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques. Biologie végétale. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066244 . tel-01133658

HAL Id: tel-01133658

<https://theses.hal.science/tel-01133658>

Submitted on 20 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale du Muséum National d'Histoire Naturelle

Bactéries associées à l'éponge Méditerranéenne *Crambe crambe* : diversité et possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques

Par Julie CROUÉ

Thèse de doctorat de MICROBIOLOGIE MARINE

Dirigée par Marcelino SUZUKI

Co-dirigée par Philippe LEBARON et Nataly BONTEMPS

Présentée et soutenue publiquement le **18 Septembre 2014**

Devant le jury composé de :

Mme Bourguet Marie-Lise, Directeur de Recherche, MNHN	Rapporteur
M. Perez Thierry, Directeur de Recherche, IMBE	Rapporteur
M. Lallier François, Professeur, Station Biologique de Roscoff, UPMC	Examineur
M. Thomas Olivier, Professeur, Institut de Chimie de Nice	Examineur
Mme. Tomasi Sophie, Professeur, Institut des Sciences Chimiques de Rennes	Examineur
Mme. Bontemps Nataly, Maître de conférence, UPVD	Co-directeur de thèse
M. Philippe Lebaron, Professeur, OOB, UPMC	Co-directeur de thèse
M. Suzuki Marcelino, Professeur, OOB, UPMC	Directeur de thèse

En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche.

De Jacques Rouxel

Les Shadocks.

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à Marie-Lise Bourguet et Thierry Pérez pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à l'ensemble du jury pour s'être déplacé sur Banyuls-sur-Mer, afin d'examiner mon travail.

Un grand merci à mon directeur de thèse Marcelino Suzuki ainsi qu'à mes co-encadrants Philippe Lebaron et Nataly Bontemps pour m'avoir dirigée pendant ces quatre années.

Merci Philippe, de m'avoir accompagné durant mon master ainsi que ma thèse et de m'avoir donnée la chance d'intégrer le Laboratoire, je ne pouvais pas espérer mieux comme cadre de travail.

Merci Marcelino, pour ces 4 années passées dans ton équipe, pour ton encadrement, tes conseils, mais aussi et surtout pour ta confiance qui m'a permis d'appréhender ce sujet et de progresser dans mon apprentissage scientifique. Je tiens également à te remercier pour ta compréhension et tes conseils face à la grande aventure de ma vie. Tu m'as permis de mener de front deux grands projets sans pression ni jugement, ce qui a été essentiel pour que tout se déroule pour le mieux.

Merci Nataly, de m'avoir fait découvrir la « vraie » chimie ! pas celle des manuels de Fac, non...bien plus complexe et intéressante !! Toujours dans la bonne humeur et disponible à chaque instant.

Je remercie également toutes les personnes avec qui nous avons collaboré durant 4 années : Olivier Thomas et Eva Ternon (Université de Nice), merci pour votre aide sur la compréhension de C. crambe; Quentin Vanbellingen et Alain Brunelle (Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette) un grand merci pour m'avoir permis de découvrir l'imagerie par spectrométrie de masse; Marie-Lise Escande, Laurence Besseau et Claude Courties (BIOM, Laboratoire Arago) grâce à vous le « monde de la microscopie » ne m'est plus inconnu; un grand merci également à Bernard Banaigs (CRIOB, Université de Perpignan) pour l'accueil ainsi que l'ensemble de ces conversations scientifiques.

Comment aurais-je réalisé cette thèse sans le soutien de tous les membres de l'équipe anciennement LOMIC nouvellement LBBM, ainsi que de la plateforme Bio2Mar!

Laurent, ta bonne humeur, ton aide sans faille, ont fait de toi un allié durant cette thèse ; Nicole et Philippe toujours présents pour répondre à mes milliards de questions ! Yoan, Sapna et Sanjay, merci d'avoir été mes collègues de galère sur notre chère C. crambe et ses petites bactéries. Nyree, merci pour ton aide précieuse, ta disponibilité et ta patience à toute épreuve.

Le bureau des filles! Cécile, Audrey, Alice et Clémence, merci pour vos sourires, votre bonne humeur, et tout le soutien que vous m'avez apporté durant ces quelques années !

Merci également Florent et Eric pour les conversations sur la terrasse du 3ème qui m'ont permis à multiples reprises d'évacuer la pression des manips et de repartir de plus belle.

Un immense Merci à mes amies et coéquipières, présentes depuis le premier jour! Caro pour ton soutien permanent à n'importe quel moment ! Alicia, drôle, colorée, toujours à l'écoute avec tellement de compréhension! Mes colocataires de choc : Clochette, touchante, toujours présente, et véritable petit cordon bleu et Marine, colocataire aussi bien de maison que de bureau ! 20h/24 ensemble à partager, discuter et rire! Beaucoup rire ! Merci les filles, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans vous.

Un grand merci à l'ensemble de ma famille, mes parents, Hugo et Louise ! De près, de loin, quelle différence ?! Vous êtes toujours là, à la seconde! Disponibles, à l'écoute et Dieu sait qu'il en faut avec moi !

Et enfin Merci à toi qui te reconnaitras, qui a été présent depuis le départ, malgré cette distance qui ne nous a jamais effrayée. Merci d'avoir parcouru avec moi près de 4 fois le tour de la Terre!

Quant à toi ma princesse, merci de me donner la possibilité de vivre la plus grande aventure de ma vie! Tu ne mesures pas encore le soutien que tu as représenté, ton sourire, tes rires et hop...l'ensemble de mes angoisses s'envole! On pourrait penser qu'un bébé vous ralentit lors d'une thèse, mais moi je pense que tu as été ma force et ma motivation!

Table des Matières

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART	13
INTRODUCTION	15
SYMBIOSES SPONGIAIRES - MICRO-ORGANISMES MARINS	17
DEFINITION SYMBIOSE	17
BIOLOGIE DES SPONGIAIRES : CONTACT ETROIT AVEC DE TRES NOMBREUX MICRO-ORGANISMES MARINS.	17
MODE D'ACQUISITION DES MICRO-ORGANISMES SYMBIOTIQUES	19
LOCALISATION DES MICRO-ORGANISMES SYMBIOTES	21
ABONDANCE DES MICRO-ORGANISMES SYMBIOTES: CLASSIFICATION DES EPONGES	22
INTERETS DE LA SYMBIOSE	24
DIVERSITE DES MICRO-ORGANISMES ASSOCIES AUX SPONGIAIRES	26
SPECIFICITE DES SYMBIOTES: EXISTENCE DE CLUSTERS MONOPHYLETIQUES SPECIFIQUES AUX EPONGES	
« SPONGE SPECIFIC CLUSTERS : SSC »	26
CARACTERISTIQUES DES COMMUNAUTES SYMBIOTIQUES DES SPONGIAIRES	27
DISTRIBUTION PHYLOGENETIQUE DES BACTERIES ASSOCIEES AUX EPONGES	30
LES SPONGIAIRES ET LEURS MICRO-ORGANISMES: RESERVOIR DE SUBSTANCES NATURELLES BIOACTIVES	33
EPONGES « LMA » : SYMBIOTES ET TOXICITE	36
L'EPONGE MEDITERRANEENNE <i>CRAMBE CRAMBE</i>	44
SOURCE DE NOMBREUX METABOLITES SPECIALISES	46
ACTIVITES DE CES ALCALOÏDES GUANIDINIQUES	47
HYPOTHESE DE BIOSYNTHESE DE CES ALCALOÏDES: POSSIBLE IMPLICATION DES POLYCETIDES-SYNTASES ?	48
MICRO-ORGANISMES ASSOCIEES A <i>CRAMBE CRAMBE</i> : ABSENCE OU PRESENCE ?	51
OBJECTIFS DE LA THESE	53
 CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION DE LA COMMUNAUTÉ MICROBIENNE ASSOCIÉE À L'ÉPONGE MÉDITERRANÉENNE <i>CRAMBE CRAMBE</i>	 55
PREAMBULE	57
PRESENTATION DES TECHNIQUES UTILISEES POUR LA CARACTERISATION DE LA COMMUNAUTE MICROBIENNE ASSOCIEE A <i>C. CRAMBE</i> .	57
RESUME DU CHAPITRE	61
ARTICLE 1	61
 CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA DIVERSITÉ MICROBIENNE CULTIVABLE ASSOCIÉE À L'ÉPONGE MÉDITERRANÉENNE <i>CRAMBE CRAMBE</i>	 71
INTRODUCTION	73
MATERIEL ET METHODES	78
ECHANTILLONNAGE	78
CONDITIONS DE CULTURE	79
ISOLEMENT ET CONSERVATION DES SOUCHES BACTERIENNES	81
IDENTIFICATION DES SOUCHES BACTERIENNES : AMPLIFICATION ET SEQUENÇAGE DE L'ARNr 16S	82
RÉSULTATS	84
A- DIVERSITE DES BACTERIES CULTIVABLES ISOLEES A PARTIR DE L'EPONGE <i>C. CRAMBE</i> PAR LA MISE EN PLACE D'UNE PROCEDURE D'ACCLIMATATION.	
B- CULTURE SUR MILIEUX SPECIFIQUES	89
C- CULTURE EN DILUTION	91
DISCUSSION	92
CONCLUSION	96

CHAPITRE 4 : <i>CRAMBE CRAMBE</i> : MÉTABOLITES BIOACTIFS ET MICRO-ORGANISMES ASSOCIÉS	97
INTRODUCTION GENERALE	99
PARTIE 1. COMPARAISON DES EMPREINTES CHIMIQUES DES BACTERIES OBTENUES LORS DE LA PROCEDURE D'ACCLIMATATION ET DES TISSUS DE <i>CRAMBE CRAMBE</i>	103
INTRODUCTION	103
MATERIEL ET METHODES	105
RESULTATS	110
A- OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION	110
B- OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'ANALYSE	111
C- COMPARAISON DES EMPREINTES CHIMIQUES DE <i>C. CRAMBE</i> ET DES BACTERIES OBTENUES PAR ACCLIMATATION	113
DISCUSSION	115
PARTIE 2. EXPERIENCES DE STRESS ABIOTIQUE <i>IN SITU</i> SUR L'EPONGE <i>CRAMBE CRAMBE</i>	116
INTRODUCTION	116
MATERIEL ET METHODES	118
RESULTATS ET DISCUSSION	122
A- COMPARAISON DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES TISSUS DE <i>C. CRAMBE</i> PRELEVES SUR DIFFERENTS SUBSTRATS : ROCHE ET MOLLUSQUE <i>ARCA NOAE</i>	122
B- ETUDE DES EMPREINTES CHIMIQUES DES TISSUS DE <i>C. CRAMBE</i> APRES CULTURE <i>EX SITU</i> ACCOMPAGNEE D'UNE ACIDIFICATION DU PH DE L'EAU ENVIRONNANTE.	123
CONCLUSION	130
PARTIE 3. CARACTERISATION DES ALCALOÏDES GUANIDINIQUES DE <i>C. CRAMBE</i> PRELEVEE A BANYULS-SUR-MER	132
INTRODUCTION	132
MATERIEL ET METHODES	132
RESULTATS ET DISCUSSION	134
A- CONSTRUCTION DE LA CARTE D'IDENTITE CHIMIQUE.	134
B- PURIFICATION ET CARACTERISATION STRUCTURALE DE L'ALCALOÏDE DE MASSE 510 G.MOL ⁻¹	138
PARTIE 4. ETUDE <i>IN SITU</i> DE LA DISTRIBUTION SPATIALE DES METABOLITES SECONDAIRES DE L'EPONGE <i>C. CRAMBE</i> PAR IMAGERIE EN MALDI-TOF	147
PREAMBULE	147
ARTICLE EN PREPARATION :	152
CONCLUSION GENERALE CHAPITRE 4	173
CHAPITRE 5	177
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	177
ANNEXES	193
BIBLIOGRAPHIE	203

Liste des Figures

Hors articles Chapitre 2 & Chapitre 4-partie 4 (in prép.).

Figure 1. Organisation générale des éponges : (a) coupe transversale d'une éponge (b) coupe transversale d'un choanocyte. (Extrait de Manuel et al., 2003).....	18
Figure 2. Localisation des micro-organismes symbiontes au sein des Spongiaires (Lee et al., 2001).	21
Figure 3. Coupe transversale d'un bactériocyte chez <i>Petrosia ficiformis</i> . MET X 25.500.	22
Figure 4. Mésophyles de (a) <i>Xestospongia muta</i> (HMA) et (b) <i>Crella cyatophora</i> (LMA)	23
Figure 5. Organisation de la communauté microbienne symbiotiques des Spongiaires (Schmitt et al., 2012b).....	28
Figure 6. Diversité bactérienne associée à 32 espèces d'éponges de localisation géographique distincte à travers le monde (données de pyroséquençage-454 ARNr16S). Distribution phylogénétique à 97% d'identité, phylum (cercle intérieur), classe (cercle du milieu), et ordre (cercle extérieur). (Schmitt et al., 2012b).....	31
Figure 7. Photo de <i>C. crambe</i> (T. Perez).	44
Figure 8 Photo A: <i>Arca noae</i> en association avec <i>C. crambe</i> Photo B : <i>Arca noae</i> sans <i>C. crambe</i>	45
Figure 9. Structures des crambescines A, B et C entre et des crambescidines.....	47
Figure 10. Hypothèse de biosynthèse de la crambescidine 800 (Snider et Shi, 1993).....	49
Figure 11. Voie de biosynthèse de l'onnamide A proposée par Piel et al., 2004.	50
Figure 12. Image en microscopie à balayage montrant la surface axénique de <i>C. crambe</i> – Barre 200 µm (Becerro et al., 1994).	51
Figure 13. Principe du pyroséquençage.....	58
Figure 14. Principe du CARD-FISH.....	60
Figure 15. Représentation schématique de la procédure d'acclimatation expérimentée.	79
Figure 16. Evolution de l'abondance des 6 genres	88
Figure 17. Représentation des différents phylotypes et genres isolés au cours des étapes d'acclimatation en fonction des dilutions.	89
Figure 18. Possibles cas de figures et interprétations de l'expérience de stress pH.....	100
Figure 19. Signature chimique de <i>C. crambe</i> récolté à Marseille.....	105
Figure 20. Gradient d'élution optimisé des analyses en conditions 1.....	107
Figure 21. Gradient d'élution optimisé des analyses en conditions 2.....	108
Figure 22. Chromatogramme d'un extrait de <i>C. crambe</i> analysé sur colonne Gemini C6-phenyl après optimisation du gradient d'élution (Conditions 1) et détection UV à 290 nm.....	112
Figure 23. Chromatogrammes d'un extrait de <i>C. crambe</i> analysé sur colonne Gemini C18 après optimisation du gradient d'élution (Conditions 2) avec détection UV à 290 nm (A) et agrandissement avec détection UV/ELSD (B).	112
Figure 24. Chromatogramme CLHP/DAD à 290 nm d'un extrait obtenu à partir de la souche R0/10 (phylotype 1) de <i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> (Conditions 1).....	114
Figure 25. Chromatogramme CLHP/DAD à 290 nm d'un extrait obtenu à partir de la souche R1/8 (phylotype 11) d' <i>Endozoicimonas elysicola</i> (Conditions 1).	114
Figure 26. Chromatogramme CLHP/DAD d'un extrait obtenu à partir de la souche R1/2 (phylotype 10) de <i>Microbulbifer cystodytense</i> (Conditions 1).	114
Figure 27. Explication schématique de l'expérience de stress en aquarium.....	120
Figure 28. Temps de prélèvements pour les expériences de culture <i>ex situ</i> additionnées d'une diminution du pH environnant à 7.0 et à 6.0.....	121
Figure 29. Chromatogrammes UV à 290 nm (Condition 1) des extraits de <i>C. crambe</i> recouvrant les deux valves d'un <i>Arca noae</i>	122

Figure 30. Rappel des temps de prélèvements pour l'expérience culture <i>ex situ</i> additionnée d'une diminution du pH environnant à 7.0.....	125
Figure 31. Exemple d'empreintes chimiques à 290 nm (conditions 2) d'une colonie sur une valve « contrôle » et sur une valve « stress » (pH 7.0) d'une même <i>Arca noe</i> au Temps 1 de l'expérience. A & A* Temps 1 de l'expérience / A: culture <i>ex situ</i> seule/ A*: culture <i>ex situ</i> additionnée d'une diminution du pH environnant à 7.0.....	125
Figure 32. Evolution des surfaces relatives (%) des 12 pics sélectionnés après application d'un stress abiotique par diminution du pH de l'eau environnante à 7.0.....	126
Figure 33. Rappel des temps de prélèvements pour l'expérience culture <i>ex situ</i> additionnée d'une diminution du pH environnant à 6.0.....	128
Figure 34. Comparaison des empreintes chimiques durant la culture <i>ex situ</i> de tissus de <i>C. crambe</i> additionnée de la diminution du pH de l'eau environnante à 6.0 (condition d'analyse 2) au Temps 1. A & A* Temps 1 de l'expérience= 5 jours / B & B* Temps 2 de l'expérience= 7 jours/ A & B : culture <i>ex situ</i> seule/ A* & B* : culture <i>ex situ</i> additionnée d'une diminution du pH environnant à 6.0.....	128
Figure 35. Evolution des surfaces relatives (%) des 12 pics sélectionnés après application d'un stress abiotique par diminution du pH de l'eau environnante à 6.0.....	129
Figure 36. Gradient d'élution de la purification en flash chromatographie.....	133
Figure 37. Chromatogramme d'un extrait de <i>C. crambe</i> (colonie 2) analysé sur colonne Gemini C18 (Conditions 2) avec détection UV à 290 nm et en spectrométrie de masse en modes d'ionisation positive et négative.....	135
Figure 38. Carte d'identité chimique d'une colonie de <i>C. crambe</i> récoltée à Banyuls-sur-Mer. .	136
Figure 39. Spectres de masse (ESI ⁺ en haut et ESI ⁻ en bas) du composé de temps de rétention 14,8 mn.	138
Figure 40. Chromatogramme CLHP (conditions 2) de l'extrait brut de <i>C. crambe</i>	139
Figure 41. Chromatogrammes CLHP des fractions 15, 16, 19, 20, 21 et 22 à 290 nm.....	139
Figure 42. Spectres de fragmentation obtenus à partir de l'ion à m/z = 511 en ESI ⁺ (en haut) et en MALDI-TOF (en bas).	141
Figure 43. Hypothèse structure et fragmentations du composé isolé.....	142
Figure 44. Spectre de RMN du composé isolé (500 MHz, CD ₃ OD).....	142
Figure 45. Hypothèse structurale proposée pour le composé isolé (numérotation selon Bondu et al. 2012).....	144
Figure 46. Hypothèses de structures des alcaloïdes à chaîne polyinsaturée de <i>C. crambe</i>	145
Figure 47. Chromatogrammes extraits du TIC en sélectionnant les ions à m/z = 497, 511, 525 et 539.	145
Figure 48. Cellules sphéruleuses observées à l'aide d'un microscope optique (A) et d'un microscope électronique (B) . Photo : Julie Croué.	148
Figure 49. Principe de l'ionisation MALDI (De Hoffman et al., 1999).....	151

Liste des tableaux

Hors articles Chapitre 2 & Chapitre 4-partie 4 (in prép.).

Tableau 1 : Eponges et leur micro-organismes associés source de produits naturels bioactifs (Lee et al., 2001).	35
Tableau 2 : Les éponges classées « LMA » : symbiontes et métabolites bioactifs.	36
Tableau 3 : Identification des différentes bactéries isolées des tissus de <i>C. crambe</i> - Procédure d'acclimatation.	85
Tableau 4 : Identification des différentes bactéries isolées des tissus de <i>C. crambe</i> – Milieux spécifiques.....	90
Tableau 5 : Comparaison du protocole standardisé « ECIMAR » et du protocole optimisé pour l'extraction des métabolites secondaires de <i>C. crambe</i>	111
Tableau 6 : Données de RMN du proton de la crambescine A2 (Bondu et al., 2012) et du composé isolé (CD ₃ OD, 500 MHz).....	143

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AOB : Ammonium Oxidizing Bacteria
ARN : Acide ribonucléique
ARP : Ankyrin Repeat Protein
ATP : Adénosine-5'-triphosphate
C. crambe : *Crambe crambe*
CARD-FISH : Catalyzed Reported Deposition-Fluorescence *In Situ* Hybridization
CHCA : Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique
CLHP : Chromatographie Haute Performance
CMF-ASW : Calcium and Magnesium Free Artificial Seawater
DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dNTPs : Désoxyribonucléotides
ECIMAR : Ecologie Chimique MARine, indicateurs de biodiversité et valorisation
ELP : Eukaryote Like Protein
ELSD : Evaporating Light Scattering Detector
ESI : Electrospray Ionisation
FADH₂ : Reduced flavin adenine dinucleotide
HMA : High Microbial Abundance
HRP : Horseradish Peroxydase
HSV : Herpes simplex virus
ITO : Indium Tin Oxide
LC/MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LMA : Low Microbial Abundance
MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MET : Microscopie Electronique à Transmission
OTU : Operational Taxonomic Unit
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : Polyethyleneglycol
PGA : Pentacyclic Guanidine Alkaloids
PKS : Polyketide Synthase
ppi : pyrophosphate inorganique
SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry
SSC : Sponge Specific Clusters
SSSC : Sponge Species Specific Clusters
TIC : Total Ion Current
TOF : Time Of Flight
TPR : Tetratricopeptide Repeat
UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultra violet
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Chapitre 1

Etat de l'Art

Introduction

L'environnement marin, représenté par les mers et océans, recouvre plus de 70% de notre planète et héberge une grande diversité de plantes, animaux et micro-organismes. Plus d'un billion de micro-organismes sont retrouvés dans chaque litre d'eau de mer et il est reconnu qu'ils dominent l'abondance, la diversité et les activités métaboliques des océans. Ces micro-organismes forment des associations symbiotiques avec de très nombreux invertébrés marins (coraux, ascidies, cnidaires, spongiaires...). Les plus anciennes interactions micro-organismes – métazoaires dateraient de la période du Précambrien, il y a près de 600 millions d'années et seraient attribuées aux spongiaires (Wilkinson et al., 1984).

La systématique des spongiaires (phylum *Porifera*) comprend 4 classes : *Demospongiae* (Sollas, 1885) (près de 95% des éponges), *Homoscleromorpha* (Dendy, 1905), *Hexactinellida* (Schmidt, 1870), et *Calcarea* (Bowerbank, 1864). Actuellement, plus de 8553 espèces d'éponges ont été décrites (Van Soest et al., 2012). Adaptées à une grande diversité de niches écologiques, elles sont retrouvées depuis le littoral marin jusqu'aux zones abyssales et sont également présentes dans les eaux douces (moins de 1% des espèces). Les éponges marines peuvent constituer l'organisme macro-benthique majoritaire et représenter près de 80% de la biomasse de certains habitats comme au niveau des régions polaires (Bergquist et al., 2001). Sessiles, elles se nourrissent par filtration de micro-organismes présents dans l'eau environnante (Vogel, 1977) et sont ainsi en contact étroit avec de très nombreux micro-organismes. Certains de ces micro-organismes pérenisent dans leurs tissus. Les éponges sont ainsi les hôtes d'une remarquable diversité de micro-organismes contribuant à leur biologie et au maintien

de leur homéostasie (Lee et al., 2001 ; Hill, 2004 ; Hentschel et al., 2006). Plusieurs auteurs ont suggéré qu'ils participent notamment à la protection de ces hôtes sessiles par la synthèse de nombreux métabolites spécialisés (Unson et al. 1994 ; Schmidt et al., 2000) et ils seraient une source de nombreuses molécules isolées d'éponges.

Symbioses spongiaires - micro-organismes marins

Définition Symbiose

Dans de ce manuscrit, le mot symbiose sera employé selon la définition originale de Anton De Bary (1879). La symbiose est définie comme étant l'association spécifique et durable de 2 ou plusieurs espèces différentes, indépendamment des bénéfices/inconvénients tirés par chacun des partenaires. Les partenaires de la symbiose sont appelés l'hôte et le(s) symbionte(s). L'association des partenaires est nommée holobionte.

Biologie des spongiaires : contact étroit avec de très nombreux micro-organismes marins.

D'organisation très simple, les éponges sont des animaux multicellulaires, ne possédant ni tissu ni organe différencié et sont, de ce fait, les métazoaires les plus primitifs. Animaux diploblastiques, les éponges sont constituées de deux couches de cellules appelées pinacoderme et choanoderme séparées par le mesohyle. Le pinacoderme est perforé d'une multitude de petits pores ou ostia, (Figure 1) d'où l'étymologie du nom Porifera donné au groupe des éponges (latin *porus* signifiant petit trou et verbe *ferre* signifiant porter).

Organismes sessiles, les éponges se nourrissent, pour la grande majorité, par filtration de larges volumes d'eau, jusqu'à 24 m³/kg/jour (Vogel, 1977). L'eau environnante chargée de particules nutritives en suspension, pénètre dans l'éponge *via* les ostia. Puis, celle-ci circule au sein des tissus par un réseau de canaux inhalants jusqu'à atteindre les chambres choanocytaires ($\approx 1 \times 10^7$ par cm³ d'éponge) (Reiswig, 1975b). Les chambres choanocytaires sont tapissées de choanocytes (plus de 150 choanocytes par chambre) (Simpson, 1984). Il s'agit de cellules à collerette munies d'un flagelle (Figure 1-b). Les

mouvements du flagelle assurent la circulation de l'eau au sein de l'éponge (Harrison et Cowden, 1976 ; Simpson, 1984). La collerette quant à elle est composée de microvillosités, qui captent les particules nutritives. Les bactéries (cyanobactéries et bactéries hétérotrophes) et micro algues phagocytées par un autre type cellulaire, les archaeocytes, satisfont les besoins alimentaires des éponges (Reiswig, 1975b). Le taux de capture des bactéries présentes dans l'eau filtrée peut atteindre jusqu'à 96% (Reiswig, 1975a ; Pile, 1997 ; Turon et al., 1997 ; Wehrl et al., 2007). L'eau rejoint ensuite un réseau de canaux exhalants avant de quitter l'éponge *via* l'oscule.

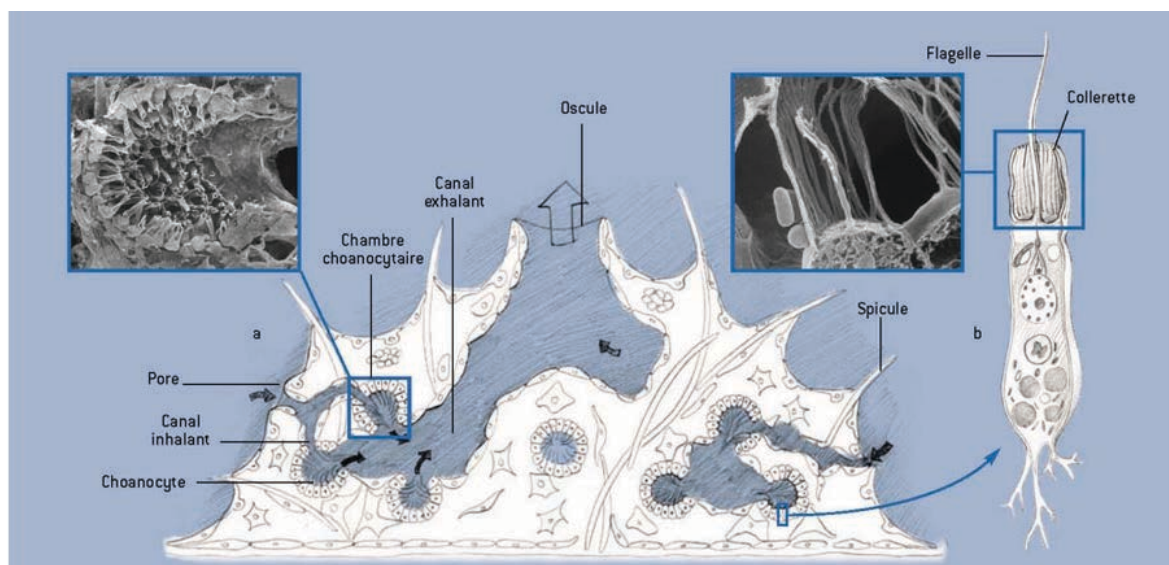


Figure 1. Organisation générale des éponges : (a) coupe transversale d'une éponge (b) coupe transversale d'un choanocyte. (Extrait de Manuel et al., 2003)

Les éponges sont ainsi en contact étroit avec de très nombreux micro-organismes et certains, résistant au processus de digestion, s'implantent au sein du mésenchyme. Les éponges sont de ce fait reconnues comme les hôtes d'une remarquable diversité de bactéries (Wilkinson 1978a, b, c ; Santavy et al., 1990 ; Hentschel et al., 2001), de

cyanobactéries (Vincente, 1990 ; Arillo et al., 1993 ; Thacker et Starnes, 2003), d'algues unicellulaires (Sara et Liaci, 1964 ; Rützler, 1988 ; Wilkinson, 1992), ou encore de champignons (Höller et al., 2000 ; Maldonado et al., 2005).

Mode d'acquisition des micro-organismes symbiotiques

Il a été démontré que les symbiontes d'éponge peuvent être acquis de la colonne d'eau par transfert horizontal et/ou des éponges « parentes » par transfert vertical *via* les gamètes ou larves lors des cycles de reproduction sexuée ou asexuée. Ce mode de transmission a été rapporté la première fois par Lévi et Porte en 1962 et mis en évidence chez de nombreuses éponges, par exemple : *Tethya citrina* (Gaino et al., 1987), *Geodia cydonium* (Sciscioli et al., 1994), *Mycale laxissima* (Enticknap et al., 2006), *Corticium candelabrum* (De Caralt et al., 2007).

Le transfert horizontal nécessite une discrimination entre les micro-organismes symbiotiques et les micro-organismes de la colonne d'eau utilisés à des fins alimentaires par l'hôte (Bergquist, 1978 ; Wilkinson, 1984). Le procédé par lequel cette discrimination est effectuée est encore mal déterminé. Deux hypothèses par lesquelles les symbiontes échapperaient au processus de digestion de l'hôte ont été proposées (Wilkinson, 1978b, 1984): (i) ils seraient spécifiquement reconnus par l'éponge et ainsi délibérément non ingérés et/ou (ii) ils seraient pourvus de système d'encapsulation permettant ainsi un masquage des sites de reconnaissance présents à leur surface les rendant alors non détectables. De nombreuses observations microscopiques de symbiontes d'éponges ont rapporté la présence d'une membrane supplémentaire les entourant, confirmant ainsi cette dernière hypothèse émise par Wilkinson en 1984.

Cependant plusieurs études supportent quant à elles l'hypothèse de reconnaissance spécifique symbionte – hôte. Il a été suggéré par Müller et collaborateurs en 1979, le rôle de la lectine dans l'agrégation des cellules d'éponges (*Geodia sp.*). Cependant le rôle biologique de cette protéine ne se résumerait pas uniquement à la réagrégation des cellules, elle interviendrait également dans l'établissement et le maintien de la symbiose comme dans le cas de l'éponge *Halichondria panicea* et sa bactérie associée *Pseudomonas insolita* (Müller et al., 1981). De récentes études de métagénomique ont également révélé la présence de gènes codant pour des protéines dites « eukaryote like proteins » (ELP) dans le génome de bactéries associées aux éponges (Thomas et al., 2010a ; Siegl et al., 2011 ; Fan et al., 2012 ; Liu et al., 2012). Parmi elles, les motifs répétés ankyrine (ARPs) et les tetratricopeptides (TPR) ont été mis en évidence dans le génome de la bactérie majoritaire associée à *Cymbastella concentrica* ainsi que dans 5 autres espèces d'éponge (Thomas et al., 2010a). Les ELPs sont des protéines retrouvées typiquement chez les eucaryotes, identifiées comme intervenant dans les interactions hôtes-symbiontes. La fonction de ces protéines atypiques chez les bactéries, est encore largement inconnue mais elles sont suspectées, comme chez les eucaryotes, de participer aux interactions micro-organismes-hôte. Des études de recombinaison génétique ont montré que l'expression des ARPs chez *Escherichia coli* modulait la phagocytose conduisant ainsi à l'accumulation de bactéries au sein des phagosomes (Nguyen et al., 2014). Ils interfèreraient dans le déroulement de la phagocytose en bloquant la fusion du phagosome au lysosome et ses enzymes digestives. Ceci constituerait un mécanisme d'échappement à la digestion par l'éponge hôte et donc de discrimination avec les bactéries de la colonne d'eau utilisées à des fins alimentaires (Nguyen et al., 2014). Un autre mécanisme proposé est l'antibiose où la communauté

symbiotique serait sélectionnée par sa résistance aux métabolites secondaires, plus justement appelés aujourd'hui métabolites spécialisés, doués de propriétés antimicrobiennes produits par l'hôte (Taylor et al., 2007).

Localisation des micro-organismes symbiontes

La distribution des micro-organismes associés aux éponges suit une organisation générale. Les micro-organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries sont majoritairement retrouvés dans l'ectoderme à proximité de la lumière (Figure 2-A). Les bactéries hétérotrophes et/ou autotrophes sont, quant à elles, hébergées au sein du mésenchyme. Les symbiontes sont généralement retrouvés libres (endosymbiontes extracellulaires) (Figure 2-B) cependant chez certaines espèces d'éponges, comme *Petrosia ficiformis*, les bactéries sont regroupées au sein de cellules spécialisées appelées bactériocytes (Vacelet et Donadey, 1977 ; Wörheide, 1998) (Figure 3). Certains symbiontes ont également été mis en évidence au sein même des noyaux de cellules d'éponge (localisation intranucléaire Figure 2-D) comme chez *Aplysina aerophoba* (Vacelet et Donadey, 1977 ; Friedrich et al., 1999).

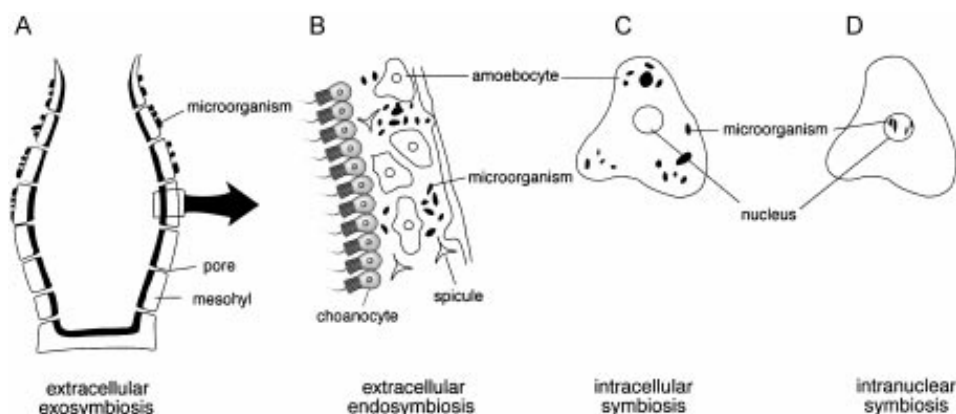


Figure 2. Localisation des micro-organismes symbiontes au sein des Spongiaires (Lee et al., 2001).

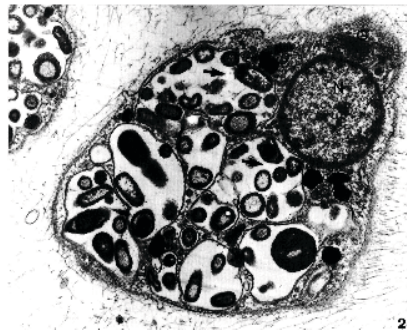


Figure 3. Coupe transversale d'un bactériocyte chez *Petrosia ficiformis*. MET X 25.500.

Abondance des micro-organismes symbiontes: classification des éponges en deux grands groupes

En 1977, des études microscopiques menées par Vacelet et Donadey mirent en évidence des différences d'abondances de micro-organismes symbiotiques en fonction des espèces d'éponges étudiées. Certaines espèces hébergent une importante concentration de micro-organismes dans leurs tissus (concentration microbienne $> 10^8$ cellules.g⁻¹ correspondant à une concentration 2 à 4 fois supérieure à celle de l'eau de mer), la biomasse microbienne contribuant jusqu'à 35% de la biomasse de l'animal (Hentschel et al., 2012) (Figure 4). Ces éponges ont été nommées « bactériosponges » (Reiswig et al., 1981) et plus récemment « high microbial abundance sponges » ou « HMA » (Hentschel et al., 2003). Elles présentent un mésohyle dense et un système aquifère complexe composé de canaux inhalants longs et tortueux entraînant ainsi une vitesse de filtration lente et donc un contact long avec l'eau de mer (Vacelet et Donadey, 1977 ; Weisz et al., 2008 ; Schläppy et al., 2010). *Petrosia ficiformis* (Poirer, 1789), *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847), *Agelas oroides* (Schmidt, 1864), ainsi que *Aplysina aerophoba* (Nardo, 1833) sont des exemples d'éponges méditerranéennes appartenant au groupe des éponges « HMA ».

D'autres espèces d'éponges, colonisant les mêmes milieux, hébergent quant à elles une

plus faible concentration de micro-organismes dans leurs tissus (concentration microbienne $<10^6$ cellules.g⁻¹, approximativement égale à celle de l'eau de mer environnante) (Hentschel et al., 2003 ; Weisz et al., 2007 ; Kamke et al., 2010). Les observations microscopiques ont montré que le mésohyle de ces éponges est pour la majorité d'entre-elles dépourvu de micro-organismes (Vacelet et Donadey, 1977 ; Weisz et al., 2007 ; Kamke et al., 2010 ; Giles et al., 2013) (Figure 4). Elles ont été nommées « non-bactériosponges » (Reiswig, 1981) ou plus récemment « Low Microbial Abundance sponges » ou « LMA » (Hentschel et al., 2003). Ces éponges présentent un système aquifère simple et ainsi une vitesse de filtration plus élevée permettant une capture plus rapide et plus active de la matière organique particulaire présente dans la colonne d'eau (Vacelet et Donadey, 1977 ; Weisz et al., 2008 ; Schläppy et al., 2010). Par exemple, *Cliona viridis* (Schmidt, 1862), *Hemimycale columella* (Bowerbank, 1874), *Oscarella lobularis* (Schmidt, 1862) ainsi que *Crambe crambe* (Schmidt, 1862) sont des éponges méditerranéennes appartenant au groupe des éponges « LMA ».

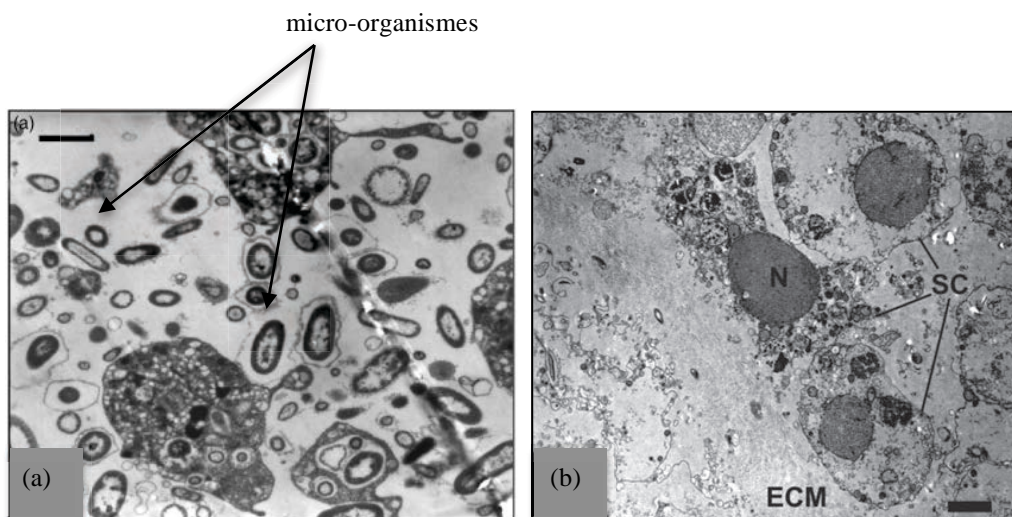


Figure 4. Mésohyles de (a) *Xestospongia muta* (HMA) et (b) *Crella cyatophora* (LMA) (N : nuclei ; SC : Sponge Cell). MET- Barre 1,5 et 2 μ m ((a) et (b) respectivement) ((a) Hentschel et al., 2006 (b) Giles et al., 2012).

Intérêts de la symbiose

De nombreuses fonctions ont été attribuées aux micro-organismes symbiotiques. Ils contribuent à la biologie et au maintien de l'homéostasie de l'hôte. Ils permettent l'incorporation directe de particules organiques dissoutes provenant de l'eau environnante (Wilkinson et Garrone, 1980) et contribuent à la rigidité structurale de l'éponge *via* la production de mucus bactérien (Wilkinson et al., 1981). Ils peuvent également protéger l'éponge hôte des rayons ultraviolets (Steindler et al., 2002) et participer à la détoxification et l'élimination des déchets produits par l'éponge elle-même (ex : transformation de l'ammonium en nitrite par des bactéries ammonio-oxydantes) (Wilkinson, 1978a ; Taylor et al., 2007 ; Hoffmann et al., 2009). Ils interviennent de plus dans la synthèse de métabolites spécialisés dont on a parfois montré l'implication dans le système de défense (contre des prédateurs, des micro-organismes pathogènes, ou encore l'épibiose), de communication ou encore de compétition pour l'espace (Bakus et al., 1986 ; Proksch, 1994 ; Unson et al., 1994 ; Bewley et al., 1996). Quant à l'éponge, elle confère aux symbiontes un habitat sûr, les protégeant notamment de la pression de broutage par des bactérivores et leur fournit également un apport important en nutriments. Les symbiontes bénéficient de l'ammonium excrétée par l'éponge mais également des carbohydrates et acides aminés produits lors de la digestion des particules alimentaires par l'éponge (Hentschel et al., 2006).

Une étude menée par Kamke et collaborateurs (2010) a montré l'activité *in situ* d'une large fraction de bactéries symbiotiques non cultivables associées aux éponges *Ancorina alata* (éponge classée « HMA ») et *Polymastia sp.* (éponge classée « LMA »), par

comparaison des ADN16S et des ARNr16S extraits de celles-ci. L'activité des micro-organismes au sein des éponges est très probablement influencée par la biologie de l'hôte mais également par de nombreux facteurs environnementaux comme les changements de température, la salinité, ou encore la luminosité (Kamke et al., 2010).

Diversité des micro-organismes associés aux spongiaires

*Spécificité des symbiontes: existence de clusters monophylétiques spécifiques aux éponges
« Sponge Specific Clusters : SSC »*

En 2002, Hentschel et collaborateurs analysèrent l'ensemble des 190 séquences bactériennes (ARNr 16S) disponibles dans les banques de données. Ils mirent en évidence des groupes monophylétiques composés uniquement de séquences ARNr16S issues d'éponges de localisations géographiques distinctes. Ces groupes (14) nommés « Groupes spécifiques aux éponges » ou « SSC pour Sponge Specific Clusters » sont définis comme : « des groupes d'au minimum 3 séquences ARNr 16S (i) provenant de différentes espèces d'éponges ou d'éponges de localisations géographiques distinctes; (ii) ayant plus de similarité entre-elles qu'avec toutes autres séquences provenant d'autres sources; (iii) étant regroupées indépendamment de la technique utilisée pour la réalisation des arbres phylogénétiques (Hentschel et al., 2002) ». En 2007, près de 32% des séquences à la fois 16S et 18S disponibles (1694 séquences) y étaient affiliées (Taylor et al., 2007), et près de 27% en 2012 (Simister et al., 2012a). Les séquences composant ces « SSCs » correspondent pour la plus grande majorité à des micro-organismes symbiotiques des éponges classées « HMA » (Hentschel et al., 2006 ; Kamke et al., 2010 ; Giles et al., 2013). Parmi les Bactéries, les *Chloroflexi*, *Cyanobactéries*, "*Poribactéries*", *Bêtaprotéobactéries*, et *Acidobactéries* sont les phyla (et classe du phylum des *Protéobactéries* dans le cas des *bêtaprotéobactéries*) contenant le plus de SSCs (Simister et al., 2012a). Une étude réalisée par Webster et collaborateurs (2010), a révélé la présence de séquences affiliées à des « SSCs » dans des échantillons d'eau de mer, suggérant que les bactéries dites spécifiques des éponges seraient en réalité

également retrouvées à l'extérieur de leur hôte. Cette étude fut complétée par Taylor et collaborateurs (2013) qui étudièrent la composition microbienne présente dans divers sources (eau de mer, sédiment, coraux...). Douze millions de séquences ARNr16S disponibles furent analysées. De nombreux micro-organismes dont les séquences étaient affiliées aux « SSCs » ont été mis en évidence dans des sources autres que les éponges à des abondances extrêmement faibles, suggérant leur capacité de survie en dehors de leur hôte. Il a alors été proposé de renommer ces micro-organismes non plus « spécifiques des éponges » mais « enrichis au sein des éponges » (Moitinho-Silva et al., 2013). De plus des analyses de PCR quantitatives menées sur ces micro-organismes « enrichis au sein des éponges » retrouvés en dehors de leur hôte montrèrent de faibles rapports transcrits/gène suggérant qu'elles seraient alors inactives (Moitinho-Silva et al., 2013).

Caractéristiques des communautés symbiotiques des Spongiaires

Communauté espèce spécifique ou « SSSC pour Sponge Species Specific Clusters »

Schmitt et collaborateurs (2012b) étudièrent les communautés microbiennes associées à 32 éponges marines d'origines géographiques distinctes. Ces éponges partagent toutes un petit nombre d'OTUs (« Operational Taxonomic Units ») bactériennes communes, probablement acquises de l'environnement par transfert horizontal. La plus grande partie de la communauté microbienne associée à ces éponges (> 50% des OTUs) est composée de micro-organismes spécifiques de chaque espèce d'éponge (SSSCs) (Figure 3). Ces bactéries dites « espèces spécifiques » sont très probablement acquises par transfert vertical. Bien que chaque éponge étudiée présente une communauté microbienne qui lui est propre, tous ces micro-organismes SSSC sont néanmoins plus

proches phylogénétiquement les uns des autres (Plus-OTUs, Figure 5) qu'avec toute autre bactérie provenant d'une source différente telle que l'eau de mer environnante (Minus-OTUs, Figure 5). La communauté microbienne associée à une éponge est ainsi composée:

- (i) d'un groupe de micro-organismes communs aux éponges, défini comme étant constitué d'OTUs partagées par plus de 70% des éponges analysées (<1% de la communauté microbienne totale (Reveillaud et al., 2014))
- (ii) d'un groupe de micro-organismes variables, défini comme partagé par moins de 70% des éponges analysées mais plus de 2 espèces distinctes
- (iii) d'un groupe « espèce spécifique » ou « SSSC » présent au sein d'une seule espèce d'éponge (ce groupe représente environ 30% de la communauté microbienne totale (Reveillaud et al., 2014)) .

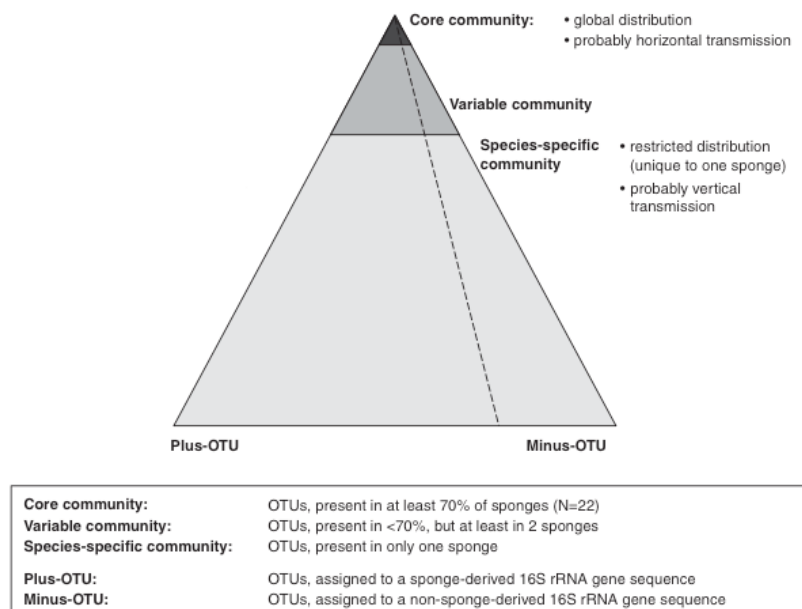


Figure 5. Organisation de la communauté microbienne symbiotiques des Spongiaires (Schmitt et al., 2012b).

Communauté microbienne : indépendante de la phylogénie et de la localisation géographique des hôtes

L'étude des communautés bactériennes associées à 32 éponges marines de localisations géographiques différentes et appartenant à 9 ordres distincts (Schmitt et al., 2012b) a révélé que les éponges tropicales partagent plus de similarité au sein de leurs symbiontes qu'avec des éponges subtropicales, cependant aucun profil géographique ou phylogénétique n'a été trouvé. Les espèces d'éponges appartenant au même ordre ne possèdent pas plus de similarité de leurs micro-organismes associés que des espèces d'ordres différents (Schmitt et al., 2012b). Il en a été de même pour l'étude menée par Webster et collaborateurs (2013) qui étudièrent les communautés bactériennes associées aux éponges marines de la Grande Barrière de Corail. Aucune corrélation entre la composition des communautés microbiennes et la phylogénie des hôtes ne fut observée suggérant que l'acquisition des micro-organismes symbiotiques serait effectuée à la fois par transfert vertical et horizontal (Webster et al., 2013). De plus la spécificité des micro-organismes symbiotiques à une espèce d'éponge donnée suggère la coévolution hôtes-micro-organismes. La coévolution des partenaires de ces symbioses a été démontrée par plusieurs auteurs (Erpenbeck et al., 2002 ; Thacker et Starnes, 2003 ; Fan et al., 2012).

Cependant des éponges phylogénétiquement plus proches et appartenant au même genre semblent avoir des communautés symbiotiques relativement similaires (Taylor et al., 2007 ; Erwin et al., 2012). Par exemple, deux espèces du genre *Xestospongia* provenant de deux océans distincts partagent certaines bactéries symbiotiques (Montalvo et Hill, 2011).

Ainsi, la communauté microbienne hébergée par une éponge est spécifique de l'hôte, indépendante à la fois de sa phylogénie à haut niveau taxonomique (i.e. Ordre) mais aussi de sa localisation géographique (Santavy et al., 1990 ; Hentschel et al., 2002 ; Taylor et al., 2004b ; Schmitt et al., 2012b ; Webster et al., 2013). Il a été suggéré que cette communauté serait stable au cours du temps (Taylor et al., 2004b ; Erwin et al., 2012).

Distribution phylogénétique des bactéries associées aux éponges

Diversité des symbiontes bactériens

Plus de 47 phyla et « phyla candidats » bactériens ont été identifiés au sein des tissus d'éponges, *via* des techniques à la fois moléculaires et/ ou culture dépendante (Webster et al., 2010 ; Schmitt et al., 2012b ; Hentschel et al., 2012 ; Reveillaud et al., 2014). Les phyla bactériens les plus représentés sont : les *Protéobactéries*, *Chloroflexi*, *Acidobactéries*, *Actinobactéries*, *Nitrospirae*, et le phylum candidat "*Poribactérie*" (Taylor et al., 2007 ; Schmitt et al., 2012b ; Hentschel et al., 2012) (Figure 6).

Le phylum candidat des "*Poribactéries*" exclusivement retrouvé chez les spongiaires a été proposé par Fieseler et collaborateurs (2004). Les membres de ce phylum présentant moins de 75% d'homologie avec les phyla bactériens les plus proches (*Planctomycètes*, *Verrucomicrobia*, et *Chlamydia*), il a été proposé comme phylum candidat et nommé ainsi pour marquer son affiliation aux éponges. Le rôle de ces bactéries est encore mal déterminé mais elles interviendraient, entre autres, dans la fixation du carbone et la synthèse de la vitamine B12 (cobalamine) (Siegl et al., 2011).

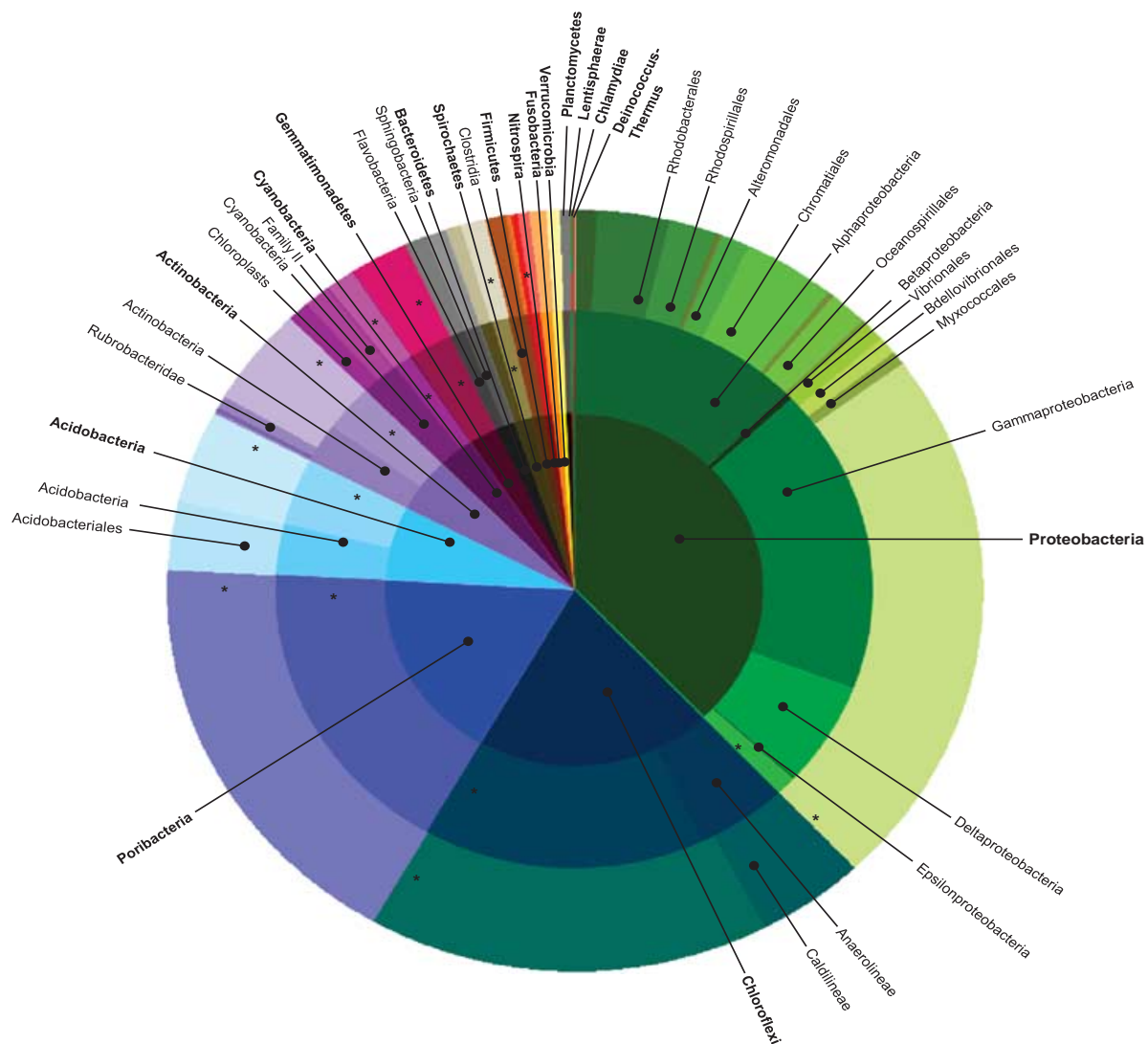


Figure 6. Diversité bactérienne associée à 32 espèces d'éponges de localisation géographique distincte à travers le monde (données de pyroséquençage-454 ARNr16S). Distribution phylogénétique à 97% d'identité, phylum (cercle intérieur), classe (cercle du milieu), et ordre (cercle extérieur). (Schmitt et al., 2012b).

Caractéristiques des communautés symbiotiques des éponges « HMA » et des éponges « LMA »

Les éponges « HMA » et « LMA » diffèrent non seulement par l'abondance des micro-organismes associés à leurs tissus mais également par la diversité et la composition phylogénétique de ces symbiontes.

Les communautés bactériennes associées aux éponges « HMA » sont dans la plupart des cas diversifiées, spécifiques, et distinctes de celles de la colonne d'eau contrairement à celles des éponges « LMA », faiblement diversifiées et longtemps décrites comme similaires à celles de la colonne d'eau (Weisz et al., 2008 ; Kamke et al., 2010 ; Erwin et al., 2011 ; Gloeckner et al., 2013 ; Giles et al., 2013). Cependant, il a récemment été démontré que les éponges « LMA » hébergeraient des micro-organismes symbiotiques spécifiques et distincts de ceux retrouvés au sein de l'environnement avec néanmoins une faible diversité (Blanquer et al., 2013 ; Croué et al., 2013 ; Mointinho-Silva et al., 2013).

Les éponges « HMA » et « LMA » présentent des spécificités relatives à la phylogénie de leurs micro-organismes symbiotiques. Les phyla des « *Poribactéries* » et des *Chloroflexi* sont majoritairement mis en évidence au sein des éponges « HMA ». (Hochmuth et al., 2010 ; Schmitt et al., 2012a ; Blanquer et al., 2013). Quant aux éponges « LMA », leurs communautés de micro-organismes associés sont généralement composées d'une OTU majoritaire affiliée le plus souvent aux *Cyanobactéries* ou à une classe des *Protéobactéries* (Kamke et al., 2010 ; Erwin et al., 2011 ; Croué et al., 2013 ; Giles et al., 2013 ; Mointinho-Silva et al., 2013).

Les Spongiaires et leurs micro-organismes: réservoir de substances naturelles bioactives

Les spongiaires sont des invertébrés sessiles qui ont dû se protéger des prédateurs, des infections par des micro-organismes pathogènes et de l'épibiose, notamment en développant des stratégies de défense chimique. Protection directe en produisant elles-mêmes de nombreux métabolites spécialisés ayant des propriétés antifongiques, antivirales, antimicrobiennes et autres (Proksch et al., 1994 ; Osinga et al., 2001) et/ou protection indirecte en hébergeant dans leurs tissus des micro-organismes responsables ou participant à la production de ces substances de défense (Thakur et Müller, 2004).

Les *Porifera* représentent un des phyla les plus étudiés pour l'investigation de nouvelles molécules actives ; près de 300 sont découvertes chaque année (Blunt et al., 2012) et sur plus de 18 000 molécules naturelles marines décrites, près de 30% ont été isolées des éponges, ce qui représente la plus importante source marine de produits naturels bioactifs (Leal et al., 2012). La classe des Demospongiae et plus particulièrement les ordres Halichondrida, Poecilosclerida, et Dictyoceratida sont les sources les plus importantes de composés (Thomas et al., 2010b). La diversité chimique des métabolites spécialisés isolés des éponges inclut des acides aminés, des peptides, des nucléosides, des macrolides, des terpènes, des porphyrines, des polycétides ainsi que des alcaloïdes et des stérols. Ces molécules constituent une large gamme de produits naturels d'intérêt pharmacologique, comme des anti-cancéreux (Bourguet-Kondracki et al., 2000 ; Rangel et al., 2001 ; Laport et al., 2009), des anti-épibiose (Fusetani, 2011), ou encore des

antibiotiques (Belarbi et al., 2003). Certains ont pu être commercialisés en thérapeutique humaine. Les premiers agents thérapeutiques commercialisés, inspirés de métabolites retrouvés chez des éponges marines sont l'Ara-A (Vidarabine) présentant des propriétés antivirales et utilisé dans le traitement de l'herpes ou du zona et l'Ara-C (Cytarabine) aux propriétés antitumorales utilisé quant à lui dans le traitement des leucémies et des lymphomes non hodgkinien. Tous deux sont des analogues de synthèse de deux nucléosides spongouridine et spongothymidine isolés de l'éponge *Cryptotethya crypta* (Bergmann et Feeney, 1950, 1951).

Les métabolites peuvent être produits par les cellules de l'éponge (Garson et al., 1998 ; Turon et al., 2000 ; Roué et al., 2010) , mais également par un/plusieurs micro-organisme(s) associé(s) (Unson et al., 1994 ; Bewley et Faulkner, 1998 ; Lee et al., 2001 ; Proksch et al., 2002 ; Roué et al., 2012) ou co-produits par l'activité simultanée de l'ensemble des partenaires de la symbiose éponge-micro-organismes (Ebel et al., 1997 ; Debitus et al., 1998). En effet, il est aujourd'hui proposé que les bactéries associées aux éponges seraient la véritable source de nombreux métabolites extraits de ces invertébrés marins (des exemples sont donnés dans le Tableau 1 de Lee et al. 2001). Les phyla bactériens reconnus comme étant les plus producteurs de métabolites spécialisés bioactifs chez les spongiaires sont les Protéobactéries, les Firmicutes, les Actinobactéries, et les Cyanobactéries (Thomas et al., 2010b).

Tableau 1 : Eponges et leur micro-organismes associés source de produits naturels bioactifs (Lee et al., 2001).

Sponge	Symbiotic microorganism ^a	Natural product ^b	Reference
<i>Aciculites orientalis</i>	Filamentous bacteria	Theonegramide	7
Antarctic sponge	B, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NC	54
<i>Aplysina</i> sp.	B, <i>Arthrobacter</i> sp.	NC	46
<i>Aplysina</i> sp.	B, <i>Bacillus</i> sp.	NC	46
<i>Aplysina</i> sp.	B, <i>Micrococcus</i> sp.	NC	46
<i>Aplysina</i> sp.	B, <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	NC	46
<i>Aplysina</i> sp.	B, <i>Vibrio</i> sp.	NC	46
<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	Archeon	NC	88
<i>Dysidea herbacea</i>	Cyanobacterium	Chlorinated metabolites	115
<i>Dysidea herbacea</i>	C, <i>Oscillatoria spongeliae</i>	Polybrominated biphenyl ethers	30
<i>Dysidea</i> sp.	B, <i>Vibrio</i> sp.	Brominated biphenyl ethers	24
<i>Halichondria okadai</i>	B, <i>Alteromonas</i> sp.	Alteramide A	103
<i>Halichondria okadai</i>	D, <i>Prorocentrum lima</i>	Okadaic acid	63
<i>Halichondria panicea</i>	B, <i>Antarcticum vesiculatum</i>	Neuroactive compounds	86
<i>Halichondria panicea</i>	B, <i>Pseudomonas insolita</i>	NC	80
<i>Halichondria panicea</i>	B, <i>Rhodobacter</i> sp.	NC	1
<i>Halichondria panicea</i>	B, <i>Psychroserpens burtonensis</i>	Neuroactive compounds	86
<i>Homophymia</i> sp.	B, <i>Pseudomonas</i> sp.	Antimicrobial compounds	10
<i>Hyatella</i> sp.	B, <i>Vibrio</i> sp.	NC	82
<i>Rhopaloeides odorabile</i>	B, β -Proteobacteria	NC	122
<i>Rhopaloeides odorabile</i>	B, γ -Proteobacteria	NC	122
<i>Rhopaloeides odorabile</i>	A, Actinobacteria sp.	NC	122
<i>Rhopaloeides odorabile</i>	B, <i>Cytophaga</i> sp.	NC	122
<i>Rhopaloeides odorabile</i>	Green sulfur bacteria	NC	122
<i>Sigmatocia symbiotica</i>	R, <i>Ceratodictyon spongiolum</i>	NC	89
<i>Suberea creba</i>	B, <i>Pseudomonas</i> sp.	NC	22
<i>Suberea creba</i>	B, <i>Pseudomonas</i> sp.	Quinolones	22
<i>Tedania ignis</i>	B, <i>Micrococcus</i> sp.	Diketopiperazines	107
<i>Theonella swinhoei</i>	B, δ -Proteobacteria	NC	97
<i>Theonella swinhoei</i>	C, <i>Aphanocapsa feldmanni</i>	NC	7
<i>Theonella swinhoei</i>	Filamentous bacteria	Theopalauamide	97
<i>Theonella swinhoei</i>	Unicellular bacteria	Swinholide A	6
Unidentified sponge	A, <i>Streptomyces</i> sp.	Urauchimycins A and B	51
<i>Verongia</i> sp.	B, <i>Aeromonas</i> sp.	NC	117
<i>Verongia</i> sp.	B, <i>Pseudomonas</i> sp.	NC	117
<i>Xestospongia</i> sp.	B, <i>Micrococcus luteus</i>	Antimicrobial compounds	9

^aA, actinomycete; B, Bacteria; C, Cyanobacteria; D, Dinoflagellate; R, Red algae.

^bNC: It was not checked.

L'implication des micro-organismes peut être présumée dans plusieurs cas :

- lorsque différentes espèces d'éponges contiennent les mêmes métabolites spécialisés (Unson et al., 1994 ; Hentschel et al., 2001). Les Halichondrines, macrolides cytotoxiques ont été isolées de plusieurs éponges de zones géographiques distinctes : *Halichondria okadai* (Hirata et Uemura, 1986), *Axinella* spp., *Phakiella carteri*, *Raspailia agminata*, et

Lissodendoryx sp. (Hart et al., 2000) laissant alors supposer une origine microbienne pour ces composés.

- lorsque la concentration en métabolites spécialisés au sein des tissus d'éponge est extrêmement faible,
- lorsque la structure chimique de ces molécules est similaire à celle des molécules produites par des micro-organismes libres (Unson et al., 1994 ; Hentschel et al., 2001 ; Piel, 2009). C'est le cas pour les polycétides (Bode et Müller, 2005).

Les éponges et leurs bactéries associées représentent un objet d'étude particulièrement intéressant tant du point de vue écologique (origine des symbioses, transmissions, rôles) mais aussi pharmacologique (sources des métabolites spécialisés, production de ces mêmes métabolites...). De plus, les éponges classées « LMA » possédant une communauté microbienne faiblement diversifiée et majoritairement constituée d'une unique OTU, représentent de bons modèles d'étude dans la détermination des rôles spécifiques de chaque micro-organisme symbiotique au sein de son hôte et plus particulièrement dans la synthèse de composés naturels bioactifs extraits de l'éponge hôte.

Eponges « LMA », Symbiontes et Toxicité

Tableau 2 : Les éponges classées « LMA » : symbiontes et métabolites bioactifs.

Classe	Ordre	Espèce	Micro-organismes associés	Métabolites secondaires
Demospongiae	Astrophorida	<i>Poecillastra compressa</i> (Bowerbank, 1866)	Marquage DAPI – ARISA : Diversité bactérienne: seulement 2 OTUs spécifiques des éponges (Schöttner et al., 2013) Pyroséquençage-454 ARNr16S: 2 OTUs majoritaires Thaumarcheota & Chromatiales (Kennedy et al., 2014)	Rien
		<i>Thenia muricata</i> (Bowerbank, 1858)	MET : Unique morphotype bactérien - localisation: intercellulaire (0,3 – 0,4µm) (Vacelet et Donadey, 1977)	Rien
	Halichondrida	<i>Acanthella acuta</i> (Schmidt, 1862)	MET : Unique morphotype bactérien localisé au sein du mésophyle (0,1 - 0,2 µm) (Vacelet et Donadey, 1977)	Isocyanosesquiterpénoides
		<i>Axinella polypoides</i> (Schmidt, 1862)	MET (Vacelet et Donadey, 1977)	Stérols / imidazoles aminés / nucléosides / bétaines
		<i>Halichondria bowerbanki</i> (Burton, 1930)	MET (Lemoine et al., 2007)	Rien
		<i>Halichondria panicea</i> (Pallas, 1766)	MET : peu de bactéries localisées au sein du mésophyle PCR ARNr16S: dominance des alphaprotéobactéries (Rhodobacter) (Althoff et al., 1998) (Wichels et al., 2006)	Sesquiterpénoides / Sesquiterpènes hydroquinones / dérivés d'acides gras
		<i>Hymeniacidon heliophila</i> (Parker, 1910)	MET : 3 morphotypes bactériens de 0.5-3.0 µm	<i>Hymeniacidon</i> sp. : isocyanosesquiterpénoides/ alcaloïdes guanidiniques bromés / peptides cycliques
			Banque de clones + T-RFLP : 389 séquences bactériennes - 4 OTUs majoritaires affiliées aux: alphaprotéobactéries (3OTUs) et aux gammaprotéobactéries (1OTU) (Erwin et al., 2011)	
		<i>Phakellia robusta</i> (Bowerbank, 1866)	Marquage DAPI (Schöttner et al., 2013)	Rien
		<i>Phakellia ventilabrum</i> (Linnaeus, 1767)	Marquage DAPI - ARISA: Diversité bactérienne: seulement 5 OTUs spécifiques des éponges (SSCs) (Schöttner et al., 2013)	Rien
		<i>Ptilocaulis</i> sp. (Lamarck, 1814)	Weisz et al., 2007 - Hentschel et al. unpublished data	Alcaloïdes guanidiniques / stéroïdes sulfatés / triterpènes
		<i>Stylissa carteri</i> (Dendy, 1889)	Pyroséquençage-454 ARNr16S : 60% séquences affiliées aux protéobactéries (Gammaprotéobactéries) & 33% aux Bacteroidetes (Lee et al., 2011)	Alcaloïdes guanidiniques bromés latonduines ; stylissazoles, carteramine, débromostevensine, débromohumanine

Demospongiae	Haplosclerida	<i>Amphimedon compressa</i> (Duchassaing & Michelotti, 1864)	MEB (Poppel et al., 2013) (Weisz et al., 2007)	Acides gras insaturés et hydroxylés/ glycosphingolipides / céramides
		<i>Callyspongia armigera</i> (Duchassaing & Michelotti, 1864)	Weisz et al., 2007- Hentschel et al. unpublished data	<i>Callyspongia sp.</i> : Alcaloïdes pyridiniques / dérivés d'acides gras polyinsaturés/monoterpénoïdes sulfatés / alkylpyridiniums
		<i>Callyspongia plicifera</i> (Lamarck, 1814)	MET (Hentschel et al., 2006) - Analyse T-RFLP: seulement 13 ribotypes (Qian et al., 2006) - MEB (Poppel et al., 2013)	
		<i>Callyspongia vaginalis</i> (Lamarck, 1814)	MET (Schmitt et al., 2007) (Hentschel et al., 2006) Banque de clones : une OTU dominante affiliée à <i>Synechococcus sp.</i> (Giles et al., 2013)	Butenolide : hydroxy-methylpentyl-dihydrofuran-2-one
		<i>Haliclona sp.</i> (Grant, 1836)	Banque de clones: Diversité bactérienne dominée par des Protéobactéries (Sipkema et al., 2009)	Nombreuses familles chimiques (131 ref dans MarinLit)
		<i>Niphates digitalis</i> (Lamarck, 1814)	MET (Schmitt et al., 2007) / MEB (Poppel et al., 2013) Banque de clones: diversité bactérienne dominée par des Alphaprotéobactéries (81% des séquences) (Giles et al., 2013)	<i>Niphates sp.</i> : alcaloïdes pyridiniques
		<i>Niphates erecta</i> (Duchassaing & Michelotti, 1864)	MET (Vacelet et Donadey, 1977; Weisz et al., 2007)	
		<i>Reniera mucosa</i> (Griessinger, 1971)	MET (Vacelet et Donadey, 1977)	Sesquiterpénoïdes (paniceins) sesquiterpène hydroquinone (renierin) eicosanoïde (mucosin)
		<i>Spongilla lacustris</i> (Linnaeus, 1759) Eponge d'eau douce.	MET: mésohyle dépourvu de micro-organisme - Analyse RFLP: 45 clones appartenant aux alphaprotéobactéries (n=19), actinobactéries (n=15), bêtaprotéobactéries (n=2) et chloroflexi (n=2) - Diversité microbienne faible et proche de celle des lacs. (Gernert et al., 2005) - Symbiose avec une algue verte Chlorella (Saller et al., 1989)	Rien

Demospongiae	Poecilosclerida	<i>Crambe sp.</i> (Schmidt, 1862)	MET (Vacelet et Donadey, 1977; Uriz et al., 1996; Becerro et al., 1994)	Alcaloïdes guanidiniques
		<i>Crella cyathophora</i> (Carter, 1869)	Banque de clones : une OTU dominante affiliée à une Alphaprotéobactérie (Giles et al., 2013)	Steroids
		<i>Hemimyscale columellae</i> (Bowerbank, 1874)	MET : symbionte intracellulaire correspondant à une bactérie calcifiante (Uriz et al., 2012) Pyroséquençage-454-ARNr16S : quelques OTUs éponges spécifiques (SSCs) (0.5% des séquences) (Blanquer et al., 2013) Dominance de la classe des Alphaprotéobactéries (Blanquer et al., 2013)	Hemimyscale sp. alcaloïdes guanidiniques
		<i>Iotrochota birotulata</i> (Higgin, 1877)	Weisz et al., 2007; Hentschel et al. unpublished data	Alcaloïdes indoliques bromés / stérols
		<i>Lissodendoryx diversichela</i> (Lundbeck, 1905)	Pyroséquençage-454 ARNr16S : 2 OTUs majoritaires Thaumarcheota et Chromatiales (Kennedy et al., 2014)	<i>Lissodendoryx sp.</i> : macrolides (halichondrins)
		<i>Mycale laxissima</i> (Duchassaing & Michelotti, 1864)	Rützler 1990 ; Weisz et al., 2007 MET : peu de bactéries au sein du mésohyle (Schmitt et al., 2007) Banque de clones + DGGE: 59 OTUs affiliées à 10 phyla bactériens (Mohamed et al., 2008)	Stérols oligoglycosides (mycalosides)
		<i>Mycale lingua</i> (Bowerbank, 1866)	Marquage DAPI – ARISA : Diversité bactérienne: seulement 11 OTUs spécifiques des éponges (Schöttner et al., 2013)	Rien
		<i>Neofibularia irata</i> (Wilkinson, 1978)	MET (Wilkinson 1978) Présence de Cyanobactéries	Rien
		<i>Raspailia topsenti</i> (Dendy, 1924)	Banque de clones : une OTU dominante affiliée à une Bêtaprotéobactérie (Giles et al., 2013)	<i>Raspailia sp.</i> : Diterpenes (raspailodanes F et G) alcaloïdes terpéniques (asmarines)
		<i>Tedania ignis</i> (Duchassaing & Michelotti, 1864)	MET (Schmitt et al., 2007) / <i>Micrococcus sp.</i> cultivé (Stierle et al., 1988)	Macrolides / alcaloïdes indoliques / crabazoles / thiazoles / diterpènes, dicétopipérazines, lactames

Demospongiae	Poecilosclerida	<i>Ulosa ruetzleri</i> (Wiedenmayer, 1977)	MET (Schmitt et al., 2007)	Alcaloïdes indoliques / dérivé d'acide gras
	Hadromerida	<i>Cliona viridis</i> (Schmidt, 1862)	MET : symbiose avec une algue Zooxanthelle (Sara et Liaci, 1964; Sarà, 1965, Rosell et Uriz, 1992) Pyroséquençage-454 ARNr16S: éponge la plus distante des autres « LMA », OTUs espèces spécifiques distinctes (Blanquer et al., 2013)	Pyrrole / alcaloïdes
		<i>Tectitethya crypta</i> (de Laubenfels, 1949)	Reiswig 1974	Spongouridine et spongothymidine = arabinose-nucleosides (<i>Criptothetya</i>)
		<i>Tethya stolonifera</i> (Bergquist & Kelly-Borges, 1991)	Pyroséquençage-454 ARNr16S: 93% des séquences affiliées aux Protéobactéries et 78 % aux Bêtaprotéobactéries (Simister et al., 2013)	Stérols
		<i>Polymastia janeirensis</i> (Boury-Esnault, 1973)	MET : peu de bactéries localisées au sein du mésohyle (Turque et al., 2008) Banque de clones: 47% des clones affiliés à une Alphaprotéobactérie non cultivée (Turque et al., 2008)	Rien
		<i>Polymastia sp.</i> (de Laubenfels, 1932)	MET (Vacelet et al. (Personal comm.), Schmitt et al., 2012b; Kamke et al., 2010) Banque de clone ARNr 16S : 84% des clones affiliés à une Alphaprotéobactérie (Kamke et al., 2010) Pyroséquençage-454 ARNr16S : Très peu de Plus-OTUs (Schmitt et al., 2012b)	Stérols
	Dictyoceratida	<i>Dysidea avara</i> (Schmidt, 1862)	DGGE : Diversité bactérienne dominée par des Protéobactéries (He et al., 2006)	Mérosesquiterpènes (Avarol, avarone et dérivés) furanosesquiterpénoïdes
		<i>Ircinia strobilina</i> (Lamarck, 1816)	Banque de clones : 35 OTUs affiliées aux Acidobactéries, Actinobactéries, Bactéroïdètes, Chloroflexi, and Cyanobactéries (Mohamed et al., 2008).	Sesquiterpénoïdes
		<i>Pleraplysilla spinifera</i> (Schulze, 1879)	MET : Unique morphotype bactérien localisé au sein du mésohyle (0 15-2.5µm) (Vacelet et Donadey, 1977) Pyroséquençage-454 ARNr16S : Diversité microbienne dominée par des Alphaprotéobactéries (Blanquer et al., 2013)	Furanosesquiterpenes

Demospongiae	Verongida	<i>Hexadella topsenti</i> (Reveillaud, Allewaert, Pérez, Vacelet, Banaigs & Vanreusel, 2012)	MET : Unique morphotype bactérien localisé au sein du mésohyle (Manconi et al., 2013) Pyroséquençage-454 ARNr16S (Blanquer et al, 2013; Reveillaud et al., 2014) : diversité bactérienne exceptionnellement importante	Bromoindoles alcaloïdes / bromotyrosine alcaloïdes
		<i>Ianthella basta</i> (Pallas, 1766)	Séquençage haut débit : 49% des séquences affiliées aux Gammaprotéobactéries (Webster et al., 2010).	Bromotyrosine alcaloïdes (Bastadins et dérivés)
Homoscleromorpha	Homosclerophorida	<i>Oscarella lobularis</i> (Schmidt, 1862)	MET (Vacelet et Donadey, 1977) Pyroséquençage-454 ARNr16S: 80,9% des OTUs affiliés aux Alphaproteobactéries (Blanquer et al., 2013)	Stérols /acides gras (5,9-hexadecadienoica acid)
Hexactinellida	Lyssacosida	<i>Sympagella</i> sp. (Schmidt, 1870)	Marquage DAPI (Schöttner et al., 2013)	Rien
Calcarea	Leucosolenida	<i>Grantia compressa</i> (Fabricius, 1780)	MET : 2 morphotypes bactériens (1,8 - 0,25 µm & 3 - 0,5 µm) (Vacelet et Donadey, 1977)	Rien
	Lithonida	<i>Petrobiona massiliana</i> (Vacelet & Lévi, 1958)	MET : Unique morphotype bactérien - localisation intercellulaire (0,15 - 0,25 µm) (Vacelet et Donadey, 1977)	Rien
	Clathrinida	<i>Pericharax heteroraphis</i> (Poléjaeff, 1883)	MET : Présence de Cyanobactéries (Vacelet et Donadey, 1977)	Rien

Le Tableau 2 regroupe les données disponibles sur les éponges classées « LMA », leurs symbiontes ainsi que les métabolites extraits de ces dernières (MarinLit 2012). Le tableau a été construit avec pour objectif de répondre à des questions liées au sujet de ma thèse telles que: « les éponges LMA sont-elles les hôtes d'une communauté bactérienne peu diversifiée? Possèdent-elles des métabolites secondaires spécifiques ? Y a t'il une corrélation entre les micro-organismes dominants dans ces éponges et les métabolites extraits des éponges ? ».

Le classement des éponges dans le groupe des « LMA » a été principalement effectué par l'observation microscopique de leurs tissus. Plus récemment, des analyses moléculaires sont venues compléter les connaissances sur les micro-organismes associés aux éponges en caractérisant leurs diversités microbiennes. Néanmoins de nombreuses éponges restent à étudier par ce type d'approche comme par exemple *Acanthella acuta* ou encore *Axinella polypoïdes*.

Le recoupement des données disponibles conforte bien la dominance des micro-organismes associés aux éponges « LMA » par une OTU majoritaire affiliée le plus souvent aux *Cyanobactéries* ou à une classe de *Protéobactéries* (Kamke et al., 2010 ; Erwin et al., 2011 ; Giles et al., 2013, Mointinho-silva et al., 2013). Quelques éponges telles que *Hexadella topsenti* ou encore *Ircinia strobilina* sont néanmoins des exceptions présentant toutes deux des diversités microbiennes exceptionnellement importantes (Blanquer et al., 2013 ; Reveillaud et al., 2014).

A l'analyse de ce tableau, il est difficile d'établir un possible lien entre la diversité microbienne de ces éponges et les familles chimiques de métabolites extraits de celles-ci.

En effet, de par la diversité des composés décrits, les éventuelles erreurs dans la détermination taxonomique des organismes étudiés en chimie, mais également par le fait que seules les molécules de structures nouvelles fassent l'objet de publications, le recoupement des données entre la diversité chimique des extraits des éponges et la diversité microbienne de ces éponges est difficile. Il est néanmoins rapporté dans la littérature le cas des dicétopipérazines extraits de *Tedania ignis*, métabolites produits par une bactérie affiliée à *Micrococcus sp.* (Stierle et al., 1988), il est également émis l'hypothèse de l'implication de micro-organismes dans la synthèse des halichondramides, macrolides extraits des éponges *Halichondria sp.* de part la ressemblance structurale de ces composés avec ceux produits par les micro-organismes (Kobayashi et Ishibashi, 1993). Ce tableau révèle la complexité des associations symbiotiques micro-organismes - éponges et la difficulté de s'appuyer sur les données croisées de la littérature. Il met en évidence la nécessité de mener des travaux d'interface entre biologistes, microbiologistes et chimistes, sur des organismes modèles communs.

L'éponge méditerranéenne *Crambe crambe*

Dans le cadre de ce travail, nous avons focalisé nos recherches sur l'espèce *C. crambe* (Figure 7). Le choix de l'éponge étudiée repose sur plusieurs critères. Le premier fut l'accessibilité de l'éponge marine : afin de faciliter les échantillonnages nous avons sélectionné une éponge abondante en Méditerranée. Le deuxième critère fut la toxicité de l'éponge marine : notre choix s'est porté sur une éponge fortement toxique possédant de nombreux métabolites spécialisés caractérisés par de précédentes études et dont la structure chimique laissait suggérer, selon certains auteurs, l'intervention de micro-organismes dans leur biosynthèse. Enfin, le dernier critère fut la faible abondance des micro-organismes associés : nous nous sommes intéressés à une éponge classée « LMA » suite à des études microscopiques mais dont la communauté bactérienne symbiotique n'avait pas encore été caractérisée.

Phylum : Porifera

Classe : Demospongiae

Ordre : Poecilosclerida

Famille : Crambeidae

Genre : *Crambe*

Espèce : *crambe* (Schmidt, 1862)



Figure 7. Photo de *C. crambe* (T. Perez).

Crambe crambe est une éponge encroûtante rouge-orangée, elle peut recouvrir une surface de 1 mètre carré et est exempte de macro-epibiontes (Becerro et al., 1994). Cette éponge colonise divers substrats durs tels que les roches, mais également la coquille d'un mollusque vivant appelé l'arche de Noé. L'arche de Noé (*Arca noae*) (Linnaeus, 1758) est une espèce de mollusques bivalves de la famille des Arcidae. Il peut être retrouvé jusqu'à 100 mètres de profondeur en Atlantique, Méditerranée, Mer Noire et plus rarement dans la Mer des Caraïbes (Nordsieck, 1969). Il a été montré que l'association entre ce bivalve et l'éponge permet de protéger le mollusque de la prédation par camouflage (Marin et Belluga, 2005) (Figure 8).



doris.ffesm.fr © Véronique LAMARE



doris.ffesm.fr © Frédéric ANDRE

Figure 8.

Photo A: *Arca noae* en association avec *C. crambe*

Photo B : *Arca noae* sans *C. crambe*

C. crambe est une éponge photophile retrouvée à de faibles profondeurs entre 5 et 60 mètres (Uriz et al., 1992) facilement accessible en plongée. Concernant sa distribution géographique, elle est majoritairement observée sur le sub-littoral de l'Ouest de la Méditerranée (Boury-Esnault, 1971; Pulitzer-Finali, 1983; Uriz et al., 1992). Elle a également été observée à l'Est de la Méditerranée sur les côtes Egyptiennes (Burton, 1936) et Turques (Saritas, 1972), dans l'océan Atlantique : aux Canaries (Maldonado et

Uriz, 1995) et à Madère (Duran et al., 2004) et rapportée une fois dans la mer Adriatique (Schmidt, 1862).

Source de nombreux métabolites spécialisés

Deux familles d'alcaloïdes guanidiniques ont été isolées des tissus de *C. crambe* (Berlinck et al., 1990, 1992, 1993 ; Jares-Erijman et al., 1991, 1993 ; Bondu et al., 2012) :

- les crambines par la suite renommées crambescines (le nom de crambine étant déjà attribué à un peptide (Van Etten et al., 1965)). 11 crambescines ont été identifiées (Bondu et al., 2012). Mono- et bicycliques, elles sont classées en 3 groupes selon la structure du groupement fixé au C-8 du cycle contenant le groupement guanidinium (Jares-Erijman et al., 1993) (Figure 9):

- les crambescines A possèdent un noyau pyrrolidine fusionné,
- les crambescines B sont caractérisées par un spiro-tetrahydrofurane et
- les crambescines C par une chaîne linéaire 3-hydroxypropyle.

- Les crambescidines 800, 816, 830, 844, l'isocrambescidine 800 et la crambidine (Jares-Erijman et al., 1991 ; Berlinck et al., 1993). Ces molécules sont qualifiées par un numéro correspondant à leur masse moléculaire (Jares-Erijman et al., 1991 ; Chang et al., 2003).

La famille des crambescidines est caractérisée par la présence d'un noyau pentacyclique lié par une chaîne linéaire de type ω -hydroxyacide, liée à une hydroxyspermidine terminale par une fonction amide. Les crambescidines isolées diffèrent par la longueur de la chaîne et la présence ou non d'un groupement hydroxyle en C-13 du noyau pentacyclique (Figure 9).

Les structures de tous les métabolites cités sont en annexes 1 et 2.

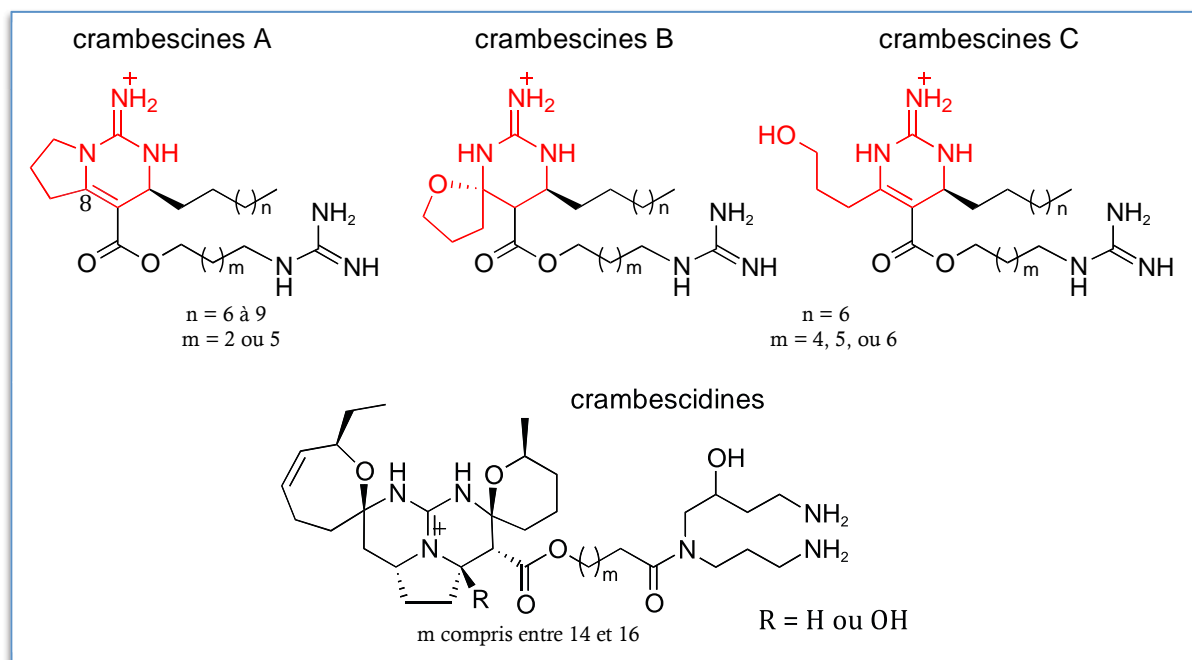


Figure 9. Structures des crambescines A, B et C entre et des crambescidines.

Activités de ces alcaloïdes guanidiniques

C. crambe est connue pour sa capacité à empêcher la colonisation de surface (fouling) ; son activité contre des microfoulers ou larves d'invertébrés témoignant de la forte toxicité de cette éponge (Uriz et al., 1996). Les extraits de *C. crambe* possèdent des activités antimicrobiennes, antifongiques (Burkholder et Ruetzler, 1969 ; Becerro et al., 1994) mais également antinéoplasiques notamment envers des cellules cancéreuses pancréatiques et prostatiques (Ottinger et al., 2012).

Les alcaloïdes extraits de *C. crambe* possèdent un large spectre d'activités biologiques : Les crambescines inhibent la fixation de la glycoprotéine gp120 du VIH-1 sur les récepteurs CD4 (Patil et al., 1995). Plus récemment, il a été démontré que ces molécules bloquent partiellement les canaux potassiques au sein des neurones corticaux d'embryons de souris (Martin et al., 2013). Cette capacité à bloquer des canaux

potassiques peut être utilisé en thérapeutique contre divers troubles tels que la Chorée de Huntington ou encore la maladie d'Alzheimer. Les crambescidines quant à elles, sont cytotoxiques sur des cellules leucémiques L1210 mais également sur de nombreuses cellules tumorales (Jares-Erijman et al., 1991 ; Berlinck et al., 1993 ; Aoki et al., 2004 ; Rubiolo et al., 2013). Elles sont antivirales vis-à-vis de l'herpes simplex de type 1 (HSV-1), antifongiques (crambescidines 800, 830 et 816) contre *Saccharomyces cerevisiae* (Rubiolo et al., 2013). La crambescidine 800 possède également des activités anti-malariales (Lazaro et al., 2006). La crambescidine 816 est quant à elle, un puissant antagoniste des canaux calciques (Berlinck et al., 1993 ; Martin et al., 2013). Ces molécules, synthétisées, font l'objet de dépôts de brevets (exemple : demande de brevet CA 2286738 pour les composés de crambescidines).

Hypothèse de biosynthèse de ces alcaloïdes: possible implication des polycétides-synthases ?

Les voies de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques, et plus particulièrement des dérivés pentacycliques (crambescidines) sont encore inconnues. Selon Snider et Shi (1993) qui s'appuient sur des travaux de synthèse biomimétique, la structure de ces métabolites suggère l'intervention de polycétides (Snider et Shi, 1993 ; Makarieva et al., 2012). Ils proposèrent comme dernière étape de synthèse de ces molécules l'addition d'un guanidinium libre à une structure proche de celle d'un polycétide (Snider et Shi, 1993) (Figure 10).

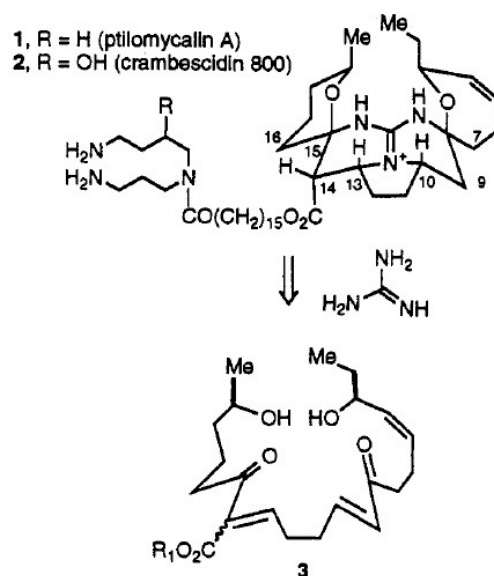


Figure 10. Hypothèse de biosynthèse de la crambescidine 800 (Snider et Shi, 1993).

De plus, pour Berlinck et collaborateurs (2008) ces alcaloïdes appartiendraient à la catégorie des guanidines polycycliques dérivés des polycétides.

Les polycétides sont une famille de produits naturels issus de la condensation de monomères d'acyl-CoA tels que l'acétyl-CoA et le propionyl-CoA, avec des unités de malonyl-CoA ou de méthylmalonyl-CoA. Leur nom provient du fait que ces composés présentent des groupements fonctionnels β -cétoniques. Après chaque réaction de condensation, le groupement β -cétonique nouvellement formé peut être réduit, hydraté et à nouveau réduit, ou bien ne subir qu'une seule modification. Ils forment ainsi une famille de produits possédant une grande diversité structurale et dont les activités biologiques sont remarquables (Gaitatzis et al., 2002). La biosynthèse de ces produits est assurée par des polycétides-synthases (PKSs), important complexe enzymatique multifonctionnel. Les PKSs sont majoritairement retrouvées chez les bactéries (Bode et Müller, 2005). Il est alors fortement suspecté que ce soient ces dernières les véritables

producteurs des métabolites de type polycétidique (Piel et al., 2004a ; Fisch et al., 2009 ; Hochmuth et al., 2009) (Figure 11) laissant alors supposer l'implication des micro-organismes associés à *C. crambe* dans la synthèse de ces alcaloïdes pentacycliques.

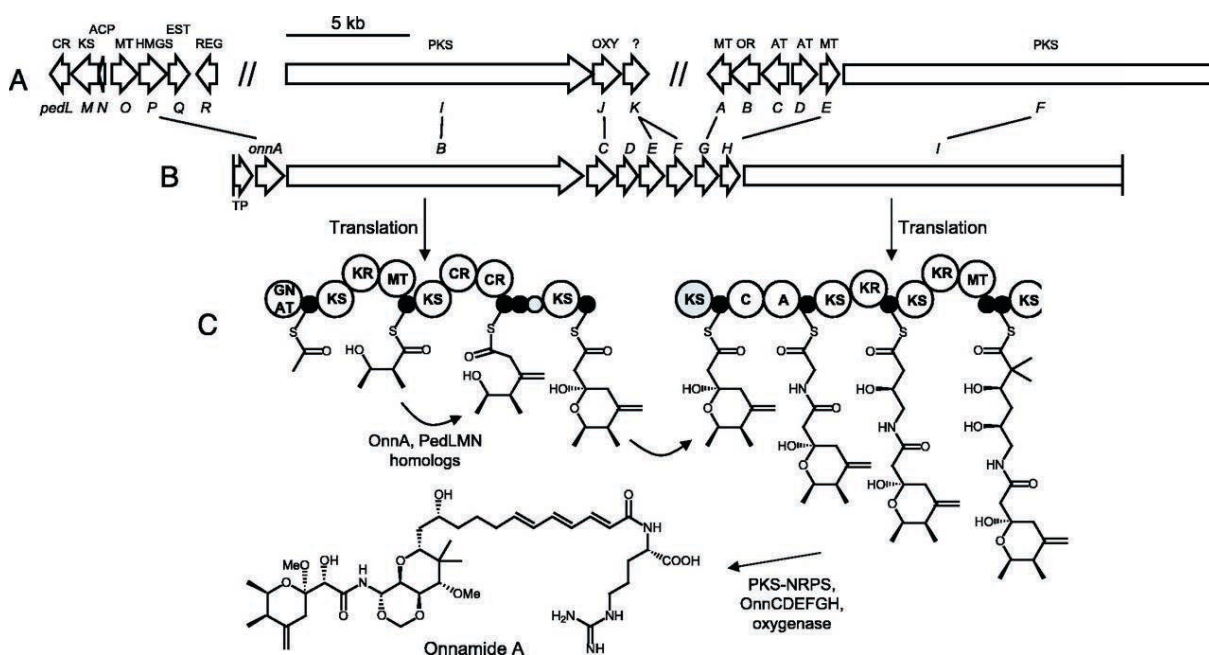


Figure 11. Voie de biosynthèse de l'onnamide A proposée par Piel et al., 2004.

De plus, les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques ont également été isolés chez des espèces d'éponges appartenant à différents genres : *Hemimycale* (Burton, 1934) (Kasham et al., 1989 ; Ohtani et al., 1992), *Monanchora* (Carter et al., 1883) (Tavares et al., 1994 ; Gallimore et al., 2005 ; Bensemhoun et al., 2007), *Batzella* (Patil et al., 1995 – 1997), *Clathria* (Schmidt, 1862) (Laville et al., 2009) et *Ptilocaulis* (Kasham et al., 1989), appuyant l'hypothèse de l'implication des micro-organismes associés à ces éponges dans leurs synthèses (Unson et al., 1994 ; Hentschel et al., 2001).

Cependant, l'hypothèse de biosynthèse des alcaloïdes pentacycliques guanidiniques de *C. crambe* par l'intervention de PKSs est controversée (communication personnelle O. Thomas, N. Bontemps, B. Banaigs), car dans la structure du noyau pentacyclique des crambescidines, on ne peut reconnaître l'enchaînement caractéristique de l'allongement des chaînes polycétidiques par le complexe enzymatique PKS bien caractérisé à ce jour. Même si des réarrangements ne sont pas à exclure en matière de biosynthèse, il est très peu probable que ce soit le cas ici puisque la structure des polycétides connus peut dans tous les cas s'expliquer par les règles de fonctionnement du complexe enzymatique.

Micro-organismes associées à Crambe crambe : Absence ou présence ?

Les études (essentiellement microscopiques) portant sur la présence ou non de micro-organismes associées à cette espèce d'éponge sont largement là aussi controversées. L'éponge *C. crambe* présente une surface dites axénique, exempte de tout organisme (Becerro et al., 1994) (Figure 12).

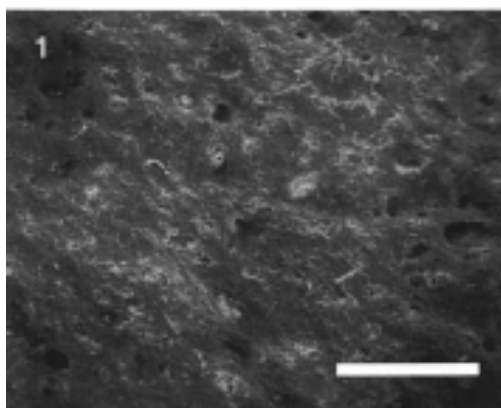


Figure 12. Image en microscopie à balayage montrant la surface axénique de *C. crambe*– Barre 200 μm (Becerro et al., 1994).

Les études microscopiques menées par Becerro et collaborateurs (1994) et Uriz et collaborateurs (1996), après observation du mésohyle de l'éponge, suggèrent l'absence de micro-organismes associés (bactéries ou cyanobactéries). Cependant ces résultats vont à l'encontre des observations réalisées par Sarà (1965) qui démontrent l'association sporadique de cyanobactéries et micro-algues à des spécimens de *C. crambe* prélevés sur les côtes italiennes. Il a, de plus, été démontré par microscopie à balayage, la présence de bactéries au sein du mésohyle de la région postérieure de la larve de *C. crambe* (Uriz et al., 2001). L'analyse, quant à elle, des banques de données regroupant l'ensemble des séquences bactériennes (ARNr16S) disponibles provenant de différentes sources, et parmi elles des spongiaires, révèle quelques séquences partielles indiquées comme extraites de *C. crambe* mais cependant issues d'une étude non publiée (Sipkema et al., données non publiées).

Objectifs de la thèse

C'est dans ce contexte controversé concernant à la fois la présence ou non de micro-organismes associés à *C. crambe* ainsi que les différentes hypothèses de biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques pentacycliques que s'inscrivent mes travaux.

Les objectifs de ce travail sont :

- (i) de caractériser à l'aide de techniques moléculaires la communauté bactérienne associée à l'éponge méditerranéenne *Crambe crambe* collectée dans la baie de Banyuls-sur-Mer **(Chapitre 2)**,
- (ii) d'étudier la diversité bactérienne cultivable associée à cette éponge par la mise en place d'une procédure d'acclimatation ainsi que par la réalisation de divers milieux de cultures spécifiques dans le but d'isoler la bactérie dominante symbiotique de *C. crambe* **(Chapitre 3)**,
- (iii) d'émettre des hypothèses sur le possible lien entre cette diversité bactérienne symbiotique et les métabolites spécialisés caractéristiques de *C. crambe* **(Chapitre 4)**. Ce dernier chapitre de résultats se décompose en plusieurs parties, la première concerne l'évaluation du rôle des micro-organismes minoritaires symbiotiques isolés de *C. crambe* dans la synthèse des métabolites caractéristiques de cette éponge et ce par comparaison des empreintes chimiques. Le micro-organisme majoritaire de la communauté microbienne symbiotique de *C. crambe* n'ayant pas été isolé, il nous a alors fallu utiliser des techniques indirectes afin d'émettre des hypothèses sur le rôle de ce micro-organisme majoritaire. Pour cela, nous avons mis en place une étude visant à modifier la communauté microbienne symbiotique de *C.*

crambe et suivi en parallèle les impacts sur la synthèse des métabolites. Enfin, nous avons étudié la distribution spatiale *in situ* des alcaloïdes guanidiniques de cette éponge par spectrométrie de masse MALDI-ToF et ToF-SIMS afin d'obtenir des informations sur les différents microenvironnements chimiques des tissus, nous donnant accès à des informations sur l'organisme pouvant intervenir dans leur synthèse ou le type cellulaire où ils sont stockés.

Chapitre 2

Caractérisation de la communauté microbienne associée à l'éponge méditerranéenne *Crambe crambe*

Article 1 :

A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*

Croué J., West N., Escande M-L., Intertaglia L., Lebaron P. & Suzuki M.

Scientific report 3:2583, doi: 10.1038/srep02583

Mots clés : *bêtaprotéobactérie/ Crambe crambe/* pyroséquençage-454 ARNr16S/ CARD-FISH/ MET

Préambule

Comme présenté dans l'état de l'art, la communauté microbienne associée à l'éponge *C. crambe* est un sujet controversé. Les études publiées portant sur les micro-organismes symbiotiques de cette éponge sont essentiellement microscopiques (Sarà, 1965 ; Vacelet et Donadey, 1977 ; Becerro et al., 1994 ; Uriz et al., 1996). L'analyse des banques de données regroupant l'ensemble des séquences ARNr16S disponibles, révèle la présence de séquences bactériennes extraites de *C. crambe* cependant issues d'une étude non publiée au début de ces travaux de thèse (Ozthürk et al., 2013).

Le premier objectif de ce travail a donc été de caractériser la communauté microbienne totale associée à cette éponge méditerranéenne par l'utilisation de techniques moléculaires (pyroséquençage-454 de l'ARNr16S total extrait des tissus de *C. crambe*) et microscopiques (hybridation *in situ* par fluorescence (CARD-FISH) et microscopie électronique à transmission).

Présentation des techniques utilisées pour la caractérisation de la communauté microbienne associée à *C. crambe*.

Le **pyroséquençage-454** est une technique de séquençage haut débit nécessitant l'action d'une cascade d'enzymes. Contrairement au séquençage de Sanger, les nucléotides (dNTPs) sont ajoutés l'un après l'autre dans le milieu réactionnel. Si le nucléotide ajouté correspond à celui attendu par la Taq polymérase, il sera incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un pyrophosphate inorganique (ppi). Ce ppi sera quant à lui transformé en ATP par l'ATP sulfurylase. L'ATP est utilisé comme

substrat par la luciférase lors de la transformation de la luciférine en oxyluciférine, produisant un signal lumineux dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP disponible (Figure 13). Ce signal lumineux est détecté par une caméra CDD (charge-coupled device) couplée au séquenceur et il est visualisé sous forme d'un pic. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps.

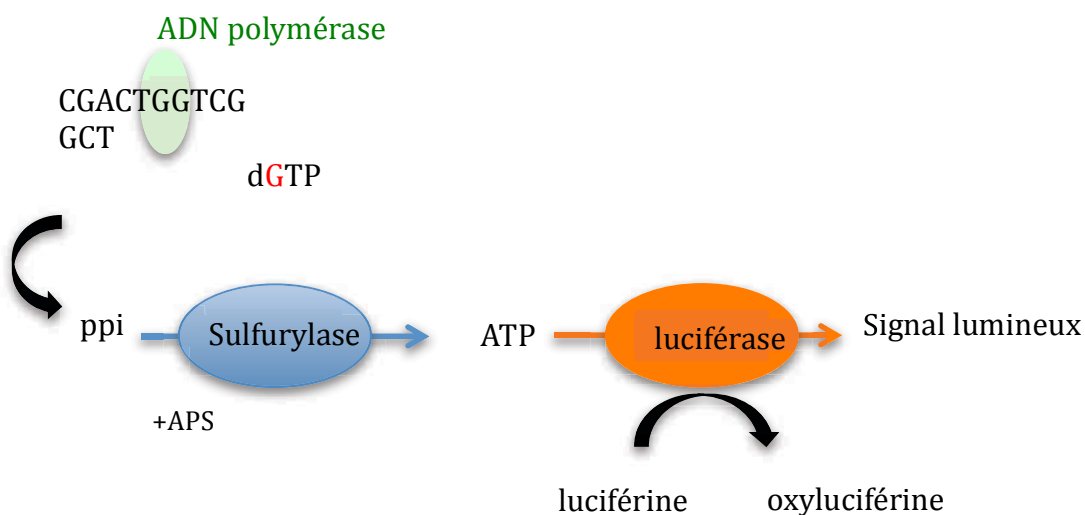


Figure 13. Principe du pyroséquençage.

Le début de ce travail a coïncidé avec le début des études de caractérisation des communautés microbiennes associées aux éponges par séquençage haut débit. En effet, la première étude caractérisant les communautés microbiennes associées aux éponges (3 espèces provenant de la Grande Barrière de Corail), par séquençage haut débit, fut réalisée en 2010 par Webster et collaborateurs. Plus de 250 000 séquences ont été obtenues et regroupées dans 23 phyla bactériens, ce qui contribua à multiplier par près de 2 le nombre de séquences ARNr16S issues d'éponge disponibles au sein des banques de données disponibles. Suivirent par la suite de nombreuses études utilisant cette technique de séquençage haut débit pour caractériser les communautés microbiennes

symbiotiques de ces invertébrés marins (Lee et al., 2011 ; Schmitt et al., 2012a, 2012b ; Dupont et al., 2013 ; Gao et al., 2014), augmentant continuellement le nombre de séquences ARNr16S disponibles et contribuant à l'avancée des connaissances portant sur les associations « micro-organismes – éponges » (diversité bactérienne, structure des communautés, transmission des symbiontes, analyse de la rare biosphère...).

Cependant, le séquençage haut débit de l'ARNr16S total est une technique indirecte de caractérisation de la communauté microbienne. De plus, de par les biais introduits (Suzuki et Giovannoni, 1996 ; Polz et Cavanaugh, 1998), il ne s'agit pas d'une technique précise d'un point de vue quantitatif. De ce fait, l'étude de caractérisation par pyroséquençage-454 de l'ARNr16S total de la communauté microbienne associée à *C. crambe* a été complétée par la **détection *in situ* des micro-organismes au sein des tissus de cette éponge** (CARD-FISH : CAlyzed Reported Deposition-Fluorescence *In Situ Hybridization*). Le CARD-FISH est une technique d'hybridation moléculaire *in situ* utilisant des sondes oligonucléotidiques couplées à une peroxydase (horseradish peroxydase : HRP). Ce procédé permet, lors de la révélation, une augmentation du signal fluorescent de près de 20 fois par rapport à la technique d'hybridation *in situ* seule (Schönhuber et al., 1997). Une fois les sondes oligonucléotidiques hybridées à la cible, le substrat de la HRP (la tyramide) couplé à un fluorochrome (FITC) est ajouté. La tyramide est alors convertie par la peroxydase en un intermédiaire réactif qui se fixe de façon covalente aux résidus tyrosine de l'échantillon (Figure 14). Cette technique est utilisée pour la localisation *in situ* et la quantification de cellules cibles ainsi que pour l'étude de la diversité constitutive d'un échantillon par l'utilisation de diverses sondes oligonucléotidiques. Les techniques de fluorescence *in situ* ont été développées, pour la plupart, pour l'analyse des communautés microbiennes (DeLong et al., 1989 ; Amann et

al., 1990 ; Pernthaler et al., 2002), mais leurs applications aux symbiontes d'invertébrés sont loin d'être triviales. Au cours de ce travail, cette technique a été adaptée aux tissus d'éponge et utilisée afin de visualiser *in situ* les micro-organismes associés à *C. crambe*, afin d'infirmar ou de confirmer les résultats obtenus par pyroséquençage-454 de l'ARNr16S quant à la diversité bactérienne présente (sonde spécifique de la bêtaprotéobactérie majoritaire BET467).

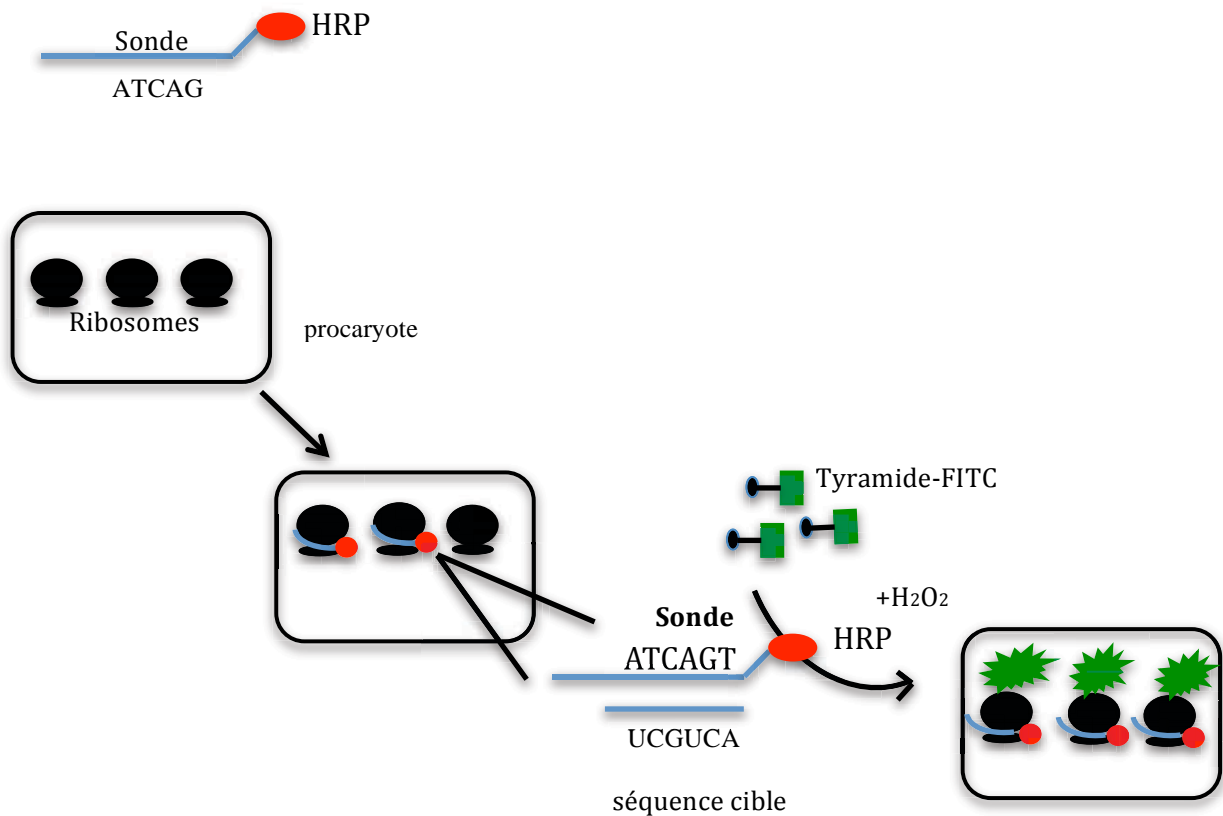


Figure 14. Principe du CARD-FISH.

Résumé du chapitre

Cette étude est la première à caractériser, par analyses moléculaires, la diversité bactérienne associée à l'éponge méditerranéenne *Crambe crambe*, précédemment considérée comme dépourvue de micro-organismes symbiotiques.

Les données de pyroséquençage-454 de l'ARNr16S total révèlent que la communauté bactérienne associée à cette éponge présente une faible diversité, dominée par une seule OTU regroupant à elle seule près de 74% de l'ensemble des séquences obtenues. Cette OTU appartient au phylum des Protéobactéries et plus particulièrement à une bêtaprotéobactérie. Ce résultat fût confirmé lors d'une étude d'hybridation *in situ* par fluorescence grâce à l'utilisation d'une sonde spécifique de ce micro-organisme (sonde BET467). Un seul morphotype bactérien localisé au sein du mésohyle de l'éponge à proximité des fibres de collagène et des cellules sphéruleuses a été observé par microscopie électronique à transmission. Ces résultats sont en accord avec les observations de Vacelet et Donadey (1977), classant les éponges *Crambe sp.* comme « non-bactériosponges » aussi appelées éponges LMA pour « Low Microbial Abundance sponge ». La dominance par une seule OTU de la communauté microbienne associée à *C. crambe*, fait de cette éponge, un modèle pertinent pour l'étude des interactions micro-organismes éponges.

Article 1

A single betaproteobacteria dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge Crambe crambe.



OPEN

SUBJECT AREAS:
MOLECULAR ECOLOGY
BIOOCEANOGRAPHY
ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY
MICROBIAL ECOLOGY

Received
17 May 2013

Accepted
12 August 2013

Published
4 September 2013

Correspondence and
requests for materials
should be addressed to
M.T.S. (suzuki@obs-
banyuls.fr)

A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*

Julie Croué^{1,2}, Nyree J. West^{1,3}, Marie-Line Escande^{1,4}, Laurent Intertaglia^{1,3}, Philippe Lebaron^{1,2} & Marcelino T. Suzuki^{1,2}

¹UPMC Univ. Paris 06, UMR 7621, LOMIC, UMR 7232, BIOM, UMS 2348 (Plate-forme Bio2Mar), Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France, ²CNRS, UMR 7621, LOMIC, F-66650, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France, ³CNRS, UMS 2348 (Plate-forme Bio2Mar), Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/Mer, France, ⁴CNRS, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/Mer, France.

Crambe crambe is a marine sponge that produces high concentrations of the pharmacologically significant pentacyclic guanidine alkaloids (PGAs), Crambescines and Crambescidines. Although bio-mimetic chemical synthesis of PGAs suggests involvement of microorganisms in their biosynthesis, there are conflicting reports on whether bacteria are associated with this sponge or not. Using 16S rRNA gene pyrosequencing we show that the associated bacterial community of *C. crambe* is dominated by a single bacterial species affiliated to the Betaproteobacteria. Microscopy analysis of sponge tissue sections using a specific probe and *in situ* hybridization confirmed its dominance in the sponge mesohyl and a single microbial morphology was observed by transmission electron microscopy. If confirmed the presence of a simple bacteria community in *C. crambe* makes this association a very pertinent model to study sponge-bacteria interactions and should allow further research into the possible implication of bacteria in PGA biosynthesis.

Marine sponges (phylum Porifera) host a diverse array of associated microorganisms including unicellular algae, Cyanobacteria, heterotrophic bacteria and Archaea^{1–5}. Although these associations are ubiquitous, the degree of association with microorganisms varies among host species. In bacteriosponges⁶ or high microbial abundance (HMA) sponges² bacteria can constitute up to 40% of their biomass and generally present a relatively high diversity while low microbial abundance (LMA) sponges harbor much smaller bacterial communities with a lower bacterial diversity^{3,4,7–9}. LMA sponges are usually dominated by one or two phyla, usually belonging to the *Proteobacteria* or the *Cyanobacteria*^{8,9} whereas HMA sponges can harbor more than 8 phyla^{7,9}. Many of the bacteria associated with sponges fall into sponge-specific clusters that have been recovered from several different sponge species but not from the surrounding seawater^{5,10}. However, an in depth pyrosequencing study on bacterial diversity in 32 sponges from 8 locations revealed that the majority of bacterial OTUs (operational taxonomic units) were specific to a given sponge⁴.

Sponges are also an important source of bioactive marine secondary metabolites making these organisms a target for research on compounds of pharmaceutical interest. The fact that many compounds found in sponges are complex polyketides or non-ribosomally synthesized peptides, whose biosynthesis is mostly associated with microorganisms suggests a bacterial origin for many sponge secondary metabolites^{11–13}. However, this has only been unequivocally proven in a few cases. For example, a *Salinospora* strain isolated from the marine sponge *Pseudoceratina clavata* has been identified as a source of rifamycin antibiotics produced via polyketide biosynthesis¹⁴.

In addition to polyketides and non-ribosomally synthesized peptides, other chemical classes such as pentacyclic guanidine alkaloids (PGAs) that exhibit a wide range of activities^{15,16} have been extracted from the tissues of marine sponges. PGAs are mostly present in sponges of the Order *Poeciloscleridae* [e.g. *Crambe* sp.¹⁷ *Monanchora* sp.¹⁸ *Batzella* sp.¹⁹ *Hemimyscale* sp.¹⁵] but also reported in *Halichondrida* sponges [e.g. *Ptilocaulis* sp.²⁰]. This relatively wide phylogenetic distribution, as well as a hypothesized -albeit controversial (Olivier Thomas, personal



communication), biosynthetic pathway involving a polyketide-like precursor^{21,22}, points to a possible involvement of microorganisms in PGA biosynthesis. Remarkably, very few studies have been conducted to examine the microbial community associated with sponges known to produce these alkaloids, mostly using electron microscopy and focusing on the sponge *Crambe crambe*.

Crambe crambe (Schmidt, 1862) (Poecilosclerida) is a red encrusting marine sponge present in the Mediterranean Sea and reported to produce diverse PGAs, namely crambescidins 800, 816, 830, 844, as well as isocrambescidin 800^{17,22}. The presence of bacteria associated with this sponge is somewhat controversial. Based on scanning electron microscopy *C. crambe* has a surface devoid of epibionts²³. In addition Uriz and colleagues reported that cells and mesohyl of this sponge were free of microsymbionts (bacteria or cyanobacteria) when examined by transmission electron microscopy²⁴. This observation contrasted to that of Sará²⁵ who reported sporadic occurrence of cyanobacteria in specimens from Italian shores. Although several thousand sponge-derived 16S rRNA gene sequences are now available⁵, the few sequences originating from *C. crambe* are from unpublished studies. Two such partial sequences clustered together within a Betaproteobacteria cluster⁵. However, since in that study the sequences were added to a tree in a second parsimony step, their phylogenetic relationship to the other sponge-derived sequences is not clear.

In order to address these contrasting reports, we examined the diversity of 16S rRNA genes amplified from extracts from the sponge

C. crambe, using 454-tag pyrosequencing and sequencing of 16S rRNA gene clone libraries for greater phylogenetic resolution. To demonstrate the presence of bacteria in *C. crambe*, the sponge tissue of a different specimen was examined using transmission electron microscopy (TEM), and the dominant bacterium was localized using a specific oligonucleotide probe combined with catalyzed reported deposition fluorescence hybridization (CARD-FISH).

Results

Bacterial community diversity analyses. 16S rRNA gene community analysis of *Crambe crambe*. A total of 43 16S rRNA gene clones from *C. crambe* tissues were sequenced. After sequence quality and chimera checks a relatively high number of clones (11) were assigned as chimeras (26% of clones). The 32 remaining clones generated 12 OTUs (> 97% identity), which fell into 4 bacterial classes: Flavobacteriia, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria and a few clones were assigned as chloroplasts. 17 sequences grouped into 9 OTUs were assigned as planktonic bacteria (> 98% identity). Phylogenetic analysis of the dominant non-chimeric and non planktonic OTU represented by 13 clones placed these sequences in a clade most closely related to the Betaproteobacteria, but separate from the known described betaproteobacterial orders (Figure 1; dashed line), and recently reported in a study of sponge-associated bacteria of the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*²⁶.

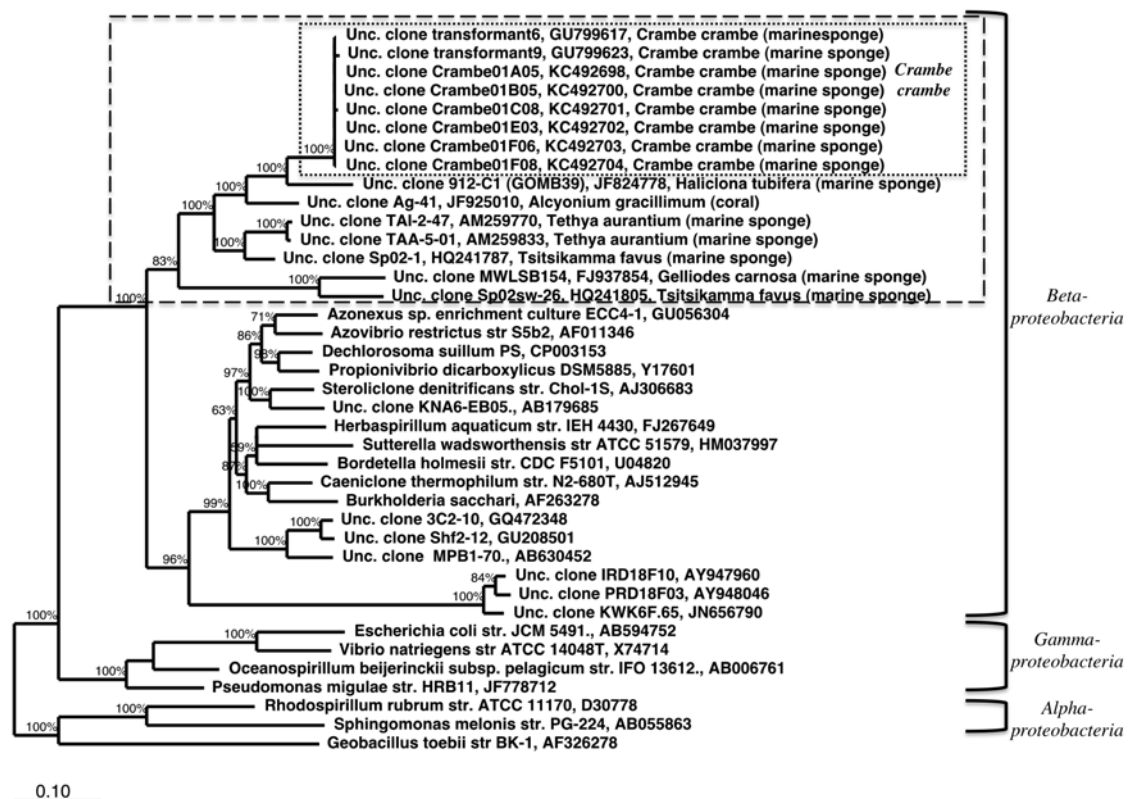


Figure 1 | Evolutionary relationship of the dominant *C. crambe* bacterium to its closest relatives inferred from almost full-length 16S rRNA gene sequences, using Bayesian phylogenetic reconstruction. Sequences obtained from the sponge *C. crambe* are shown in the smallest box. The accession numbers of the *C. crambe* sequences obtained in this study are pre-fixed by KC. A cluster of sequences associated with marine sponges and a coral is shown within the dashed lines. Percentage confidences for the Bayesian analysis are indicated at each node.



454- 16S rRNA Pyrosequencing analyses. From an initial 5973 raw bacterial 16S rRNA tag sequences obtained from *C. crambe*, 4421 sequences remained after denoising by *AmpliconNoise*. Subsequent stringent chimera detection removed a significant number of chimeric sequences, many of which were singletons, which would have otherwise significantly overinflated the total bacterial diversity (213 chimeric sequences representing 70 OTUs). Rarefaction analysis of non-chimeric sequences shows a low level of diversity with rarefaction curve reaching a plateau at about 115 OTUs (Figure S1). This low diversity was also reflected by a Chao1 value of 107.7 and a small total number of OTUs recovered (86 OTUs). Furthermore, among these OTUs, a single OTU, very similar (> 99% identity) in the V1-V3 region to the dominant clone in the 16S rRNA library, represented 74% of the total sequences (3271 sequences). Among the remaining 85 OTUs, 42 (representing 22% of total sequences) were classified as planktonic. Therefore, considering only non-planktonic bacteria, likely transient in the sponge, this dominant betaproteobacterium accounted for a remarkable 95% of the total sequences.

Catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization analyses (CARD-FISH). After optimization, CARD-FISH with the general bacterial probe confirmed the presence of bacteria in the sponge tissue. Initial hybridization experiments were performed with the general bacterial probe EUB338-I and the negative control probe NON338 according to a previously published protocol for worm symbionts²⁷ except that a lysozyme permeabilization step was necessary to obtain a good fluorescent signal. Strong signals

were observed with the EUB338-I probe (Figure 2a) demonstrating the presence of sparsely distributed bacteria within the sponge tissue corresponding to smaller cells labeled with DAPI (Figure 2b).

The DAPI staining showed two types of cells with some variation in size (Figures 2b–d). Based on an overlap between DAPI staining and the bacterial probe hybridization, we identified the smaller cells as bacteria and the larger spherical cells (Figure 2b; arrow) as the nuclei of sponge cells. Observation of different tissue sections showed the same results indicating that bacteria were sparsely distributed in all tissues of the sponge. Negative controls including the anti-sense probe NON338 and a no-probe control yielded no signals indicating the stringency of the hybridization and a lack of endogenous peroxidases in the sponge tissue.

The same tissue sections were also stained with DAPI and hybridized with the specific BET 467 probe and its helper probes (sequences shown in Table 1). Strong signals were observed with this specific probe (Figure 2c). Probe BET467 hybridized to the overwhelming majority of the small cells stained with DAPI and identified as bacteria (Figure 2c–d; circles) demonstrating a dominant presence in tissues of *C. crambe* of the betaproteobacterial clade found in the clone library and pyrosequencing. Not all the bacteria present (EUB 338-I) in the sponge mesohyl were hybridized with the specific BET467 probe (Figure 2c–d; square) in accordance with the clone library and 454-pyrosequencing results that indicated that other bacteria were also associated with the sponge. Tissue sections were also hybridized with probe BET42a targeting the Betaproteobacteria class (along with a competitor unlabeled probe targeting

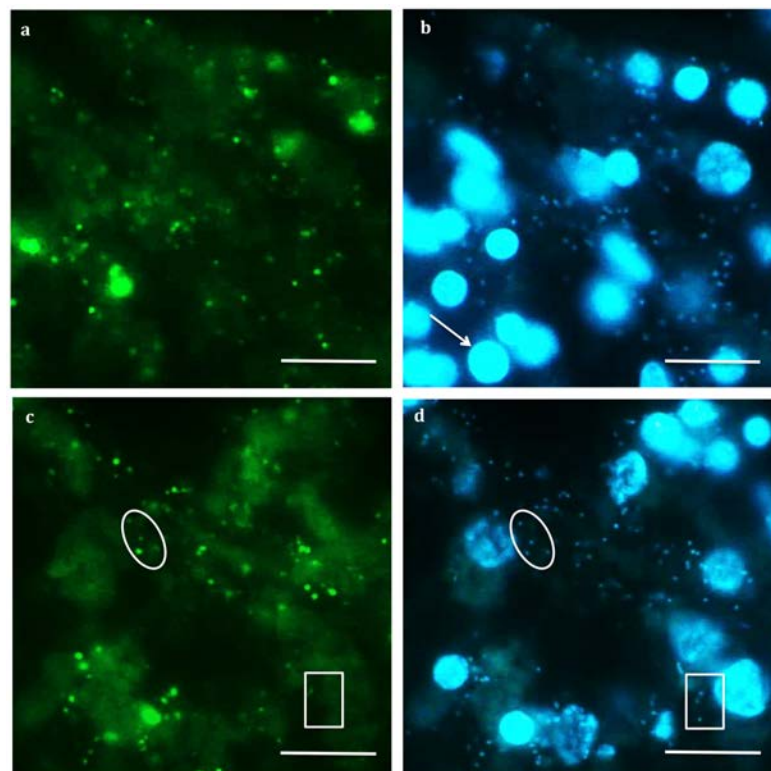


Figure 2 | Detection of bacteria in the mesohyl of *Crambe crambe* by CARD-FISH on sponge-tissue sections. Tissue section hybridized with the EUB 338 probe targeting the domain Bacteria, (a) and the corresponding DAPI-stained image, (b). Tissue section hybridized with the BET467 probe targeting the specific Betaproteobacteria, (c) and the corresponding DAPI-stained image, (d). Arrow: sponge cell nucleus. Oval: cells labeled with both DAPI and the BET467 probe. Rectangle: some cells labeled with DAPI do not hybridize with the BET467 probe.



Table 1 Details of the specific horse-radish peroxidase (HRP) labeled oligonucleotide probes used in this study, together with the unlabeled competitor and helper (H-) probes					
Probe	Sequence (5'-3')	Specificity	E.coli target position	Label	Reference
EUB338-I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	16S rRNA 338-355	HRP	62
NON-EUB338-I	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Eubacteria Negative control	16S rRNA 338-355	HRP	63
BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTT	Betaproteobacteria	23S rRNA 1027-1043	HRP	64
BET42a competitor	GCCTTCCCACATCGTT	Gammaaproteobacteria	23S rRNA 1027-1043	-	64
ARCH915	GTGCTCCCCGCAATTCT	Archaea	16S rRNA 915-934	HRP	65
BET467	CGTCATGGACGCGGCCTG	<i>C. crambe</i>	16S rRNA 467-484	HRP	This study
H-485	GGCGCTTCTCTCAGGTAC	Helper	16S rRNA 485-504	-	This study
H-446	TTCGCCCGCGTTTITCTTC	Helper	16S rRNA 446-466	-	This study

Gammaproteobacteria). Surprisingly no signal was detected. Finally, no signal was detected in hybridizations with the ARCH915 probe suggesting the absence of Archaea in *C. crambe*. Even though FISH targeting eukaryotes was not performed, only sporadically red/orange fluorescence was observed under green excitation, thus it is unlikely that photosynthetic eukaryotes or cyanobacteria are important members of the microbial community associated with *C. crambe*.

Although we did not use a confocal microscope, and thus did not accurately quantify bacterial cells, an analysis of 20 different 20 μm^2 areas showed an average of 6 bacterial cells/sponge cell (5 Betaproteobacteria/sponge cell), resulting roughly in 3000 bacterial cells (2500 Betaproteobacteria cells) per cm^2 of thin section. Since these micrographs were not randomly visualized, these numbers are likely upper estimates.

Transmission electron microscopy of thin sections of *Crambe crambe* tissue. Ultra thin sections were prepared from one specimen of *C. crambe* and inspected by transmission electron microscopy to observe the localization and the morphotypes of bacteria associated with this sponge. The results revealed a low density of morphologically uniform intercellular bacteria scattered in the mesohyl compartment of *C. crambe*. Bacteria were found embedded in the collagen matrix (Figure 3a-b) in the mesohyl, surrounding sponge cells remarkably including spherulous cells (Figure 3b-c). The rod-shaped bacteria of approximately 0.25 μm width and 0.5 μm length present dense chromatin condensation and an undulating surface. Bacteria in a potential state of cell division were also found in the mesohyl of the sponge, suggesting that the betaproteobacterium may be actively growing in the sponge tissue

(Figure 3d). Ultra thin sections from the 10 subsamples cut in different orientations were observed under the transmission electron microscope and similar results were found.

Discussion

To date, all investigations of microorganisms associated with sponges in the genus *Crambe*, were performed by electron microscopy and microbial cultivation. Early studies^{1,25}, reported low densities and diversity of microorganisms associated with these sponges. Later studies suggested that in fact those sponges were virtually devoid of epibionts and mesohyl-associated bacteria and this absence was suggested to be linked to the high toxicity associated of extracts of the sponge²⁴.

Our results demonstrate, through a combination of molecular techniques and microscopic studies, that bacteria can be associated with the tissues of the PGA containing sponge *C. crambe*, and that in our samples these bacteria overwhelmingly belong to a specific clade affiliated to the Betaproteobacteria (95% of the total non planktonic sequences generated with 454 pyrosequencing) in agreement with a recent report that specific bacteria (particularly within the phylum Proteobacteria) were found as dominant members of microbial communities associated with LMA sponges⁶. We believe that confirmation of a single dominant OTU was possible because we used a stringent denoising and chimera detection pipelines, as well as our bioinformatic approach to “filter” out primarily planktonic organisms. This dominant bacterial OTU was affiliated to a specific uncultured betaproteobacterial clade, which was not identified amongst the planktonic bacteria compiled from the literature, and a large 16S rRNA cloning effort²⁹. Attempts to cultivate this microorganism in

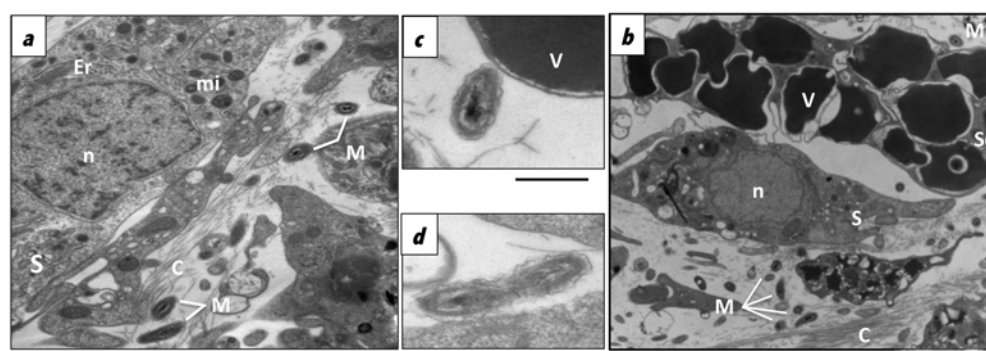


Figure 3 | Transmission electron microscopy of thin sections of *C. crambe* tissues. Microorganisms in the mesohyl of *C. crambe* embedded in the collagen matrix of the sponge, (a). Proximity between microorganisms and spherulous cells, (b-c). Bacteria in division, (d). C: collagen; Er: endoplasmic reticulum; mi: mitochondrion; M: Microorganisms; n: nucleus; S: sponge cell; Sc: Spherulous cell whose vesicles (V) contain an electron dense material.



rich and diluted R2A broth, as well as in media targeting ammonium-oxidizing bacteria were unsuccessful (data not presented).

The phylogenetic analyses of full-length 16S rRNA genes demonstrated that the clade including the *C. crambe* Betaproteobacteria branches separately from the clade containing the remainder of previously described and cultured Betaproteobacteria (dashed box in Figure 1). This clade contains exclusively sequences of bacteria associated with marine invertebrates including sequences of clones in an unpublished clone library of bacteria retrieved from *C. crambe* (D. Sipkema personal communication) that was sampled from a different site in the Mediterranean Sea, clones retrieved from the sponge *Haliclona tubifera* and clones from another LMA sponge *Tethya aurantium*, also from the Mediterranean Sea²⁶. It is important to remark that in the available Silva 108 taxonomy this clade was assigned as Nitrosomonadales (thus in the main Betaproteobacteria branch), but our refined phylogenetic placement supports the basal placement of the clade within the Betaproteobacteria as reported by Thiel and collaborators²⁶. This clade placement could be 1) real or 2) an artifact caused by a higher evolutionary rate known to occur in symbiotic microorganisms^{30,31}. Case 1) above is supported by the observation that the probe Bet42a for the class Betaproteobacteria (targeting the 23S rRNA) did not yield a signal in CARD-FISH experiments targeting the *C. crambe* symbiont, indicating that this clade is distant from the remainder of the Betaproteobacteria. Metagenomic analyses in progress should allow us to clarify the real phylogenetic placement of this clade by the analysis of additional conserved genes.

Interestingly, several attempts to amplify a large fragment of the rRNA operon as previously described by Suzuki and coworkers³² failed, despite the use of several combinations of forward primers targeting the 16S rRNA gene and reverse primers targeting the 23S rRNA, strongly suggesting that the 16S rRNA gene is unlinked to the 23S rRNA gene in the *C. crambe* associated bacterium (data not shown). Both unlinked 16S-23S rRNA genes and large insertions in the rRNA operon are common in endosymbiotic bacteria and obligate intracellular parasites^{33,34}, thus supporting Case 2) above and if proven would suggest a stronger and perhaps obligatory symbiosis between this betaproteobacterium and *C. crambe*. If this were the case, it would be interesting to determine how the dominant *C. crambe* associated bacterium is acquired. This betaproteobacterium could be part of the “rare biosphere” which would be filtered by sponge and whose growth is favored in the sponge tissue. Alternatively there could be a vertical transfer of the bacteria via their larvae since bacteria were observed in the mesohyl, the surface and in the posterior region of *C. crambe* larvae²⁸. This form of transmission is common in sponges and insects when the bacteria are obligate symbionts^{35,36}. Interestingly, the reproductive stages of LMA sponges were generally reported as bacteria-free³⁷. Regardless of their origin, the maintenance of the desired symbionts and exclusion of other bacteria by the host sponge may be mediated through the mechanism of antibiosis³⁸. This mechanism is based on the ability of few bacteria to adapt to the presence of antibiotics produced by the host. *C. crambe* is known to produce a wide variety of toxic compounds with high antimicrobial activity²³, which could help explain the selection of a single symbiont.

To confirm the localization of bacteria within the tissues of *C. crambe*, two complementary microscopy techniques were employed. The TEM pictures revealed a low density of morphologically uniform intercellular bacteria scattered in the mesohyl of *C. crambe*, already noted by Vacelet and Donadey in 1977 for *Crambe* sp.¹ and in agreement with previous observations reporting that microorganisms associated with LMA sponges, are sparse and free living in the sponge mesohyl¹. Interestingly the dominant bacterial morphotype was also observed surrounding the spherulous cells (Figure 3) that are specialized cells that seem to be responsible for the storage of secondary metabolites^{24,39,40}. The proximity between bacteria and these

specialized cells could indicate their possible resistance to the highly-toxic compounds isolated from *C. crambe*, and further support the symbiosis between these organisms. The observation of several bacteria in the process of cell division suggests that these bacteria are active. In the LMA sponge *Polymastia* sp., the dominant Alphaproteobacteria phylotypes were represented in 16S rRNA clone libraries constructed from both DNA and RNA also suggesting that the bacteria in these LMA sponges were active⁷.

The application of a specific oligonucleotide probe in conjunction with CARD-FISH allowed us to microscopically demonstrate the presence of the dominant betaproteobacterium within the *C. crambe* tissues, which to our knowledge has not been shown for other single associations between Proteobacteria and LMA sponges. The majority of the bacteria (Figure 2d) were also labeled with the specific probe (Figure 2c) in agreement with the dominance of this bacterial OTU in the 16S rRNA gene clone library and in the pyrosequencing data.

In our study, two sponge specimens collected one year apart were used, and using alternative techniques showed agreeing results. Sequencing of 16S rRNA genes in the 2011 sample and CARD-FISH with the 2012 sample, show the dominance of the same specific bacterium in these two specimens suggesting that the association between the betaproteobacterium and *C. crambe* is stable, although sampling through an annual cycle with replicate sponge specimens should be done to confirm this. Such a study was carried out on the LMA sponge *Tethya stolonifera*. In that sponge, the dominant bacterial OTU was also affiliated to a sponge-specific Betaproteobacteria cluster and the community remained very stable over a two-year period⁹.

A comprehensive study of sponge symbionts revealed 26 different bacterial phyla with most of the diversity occurring within the Proteobacteria⁴. The bacterial sequences retrieved from tropical sponges were more closely related to each other than from the subtropical ones, indicating that bacterial community composition could be influenced more by temperature than their localization in the same water mass⁴. This latitudinal separation of bacterial communities was also shown for five LMA sponges where the temperate sponge *Raspailia topsenti* was dominated by Betaproteobacteria whereas the tropical LMA sponges were dominated by Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria or Cyanobacteria⁸. Betaproteobacteria sequences also represented the dominant OTU in the temperate LMA sponges *Tethya stolonifera*⁹, and in *Scopolina* sp. and *Tedania anhelans*⁴¹. These independent studies and our own indicate that Betaproteobacteria-LMA sponge associations in temperate waters may be a global feature but that within this clade, each sponge appears to harbor a phylogenetically distinct betaproteobacterial OTU.

Our study adds further weight to others, which have shown the low diversity within LMA sponges, making them simpler models to study the roles and molecular basis of these symbioses. From a practical standpoint in contrast to HMA sponges which harbor dense and diverse microbial communities^{2,6}, metagenomic or single-cell genomic techniques⁴² would be simpler to conduct with simpler models such as LMA sponges harboring a single dominant OTU, as would be techniques such as transcriptomics and proteomics to study the expression of specific bacterial genes. Furthermore, a possible role of bacteria in the synthesis of secondary metabolites extracted from highly active sponges would be easier to evaluate in LMA sponges. In the specific case of *C. crambe*, and its secondary metabolites, earlier results reporting the lack of associated microflora^{23,24}, as well as the known high concentrations of guanidine alkaloids (about 1% of dry mass) strongly supported the idea that the sponge cells were solely responsible for the biosynthesis of these highly bioactive metabolites. However, biomimetic studies indicate that crambescidine-like molecules are produced via a condensation of guanidine to a polyketide-like molecule²¹, and since polyketides are primarily produced by microorganisms, this biosynthesis model suggests a microbial



implication in PGA biosynthesis. Our report of the dominance of a single OTU in the tissues of *C. crambe*, means that the implication of these bacteria in the biosynthesis of PGAs cannot be completely ruled out.

Methods

Sample collection. The *Crambe crambe* specimen (one sponge individual growing in a rocky substrate) for 16S rRNA gene analysis were collected in the Bay of Banyuls-sur-Mer (Western Mediterranean, France; 42° 28.828' N – 3° 08'666' E) at a depth of approximately 10 meters on 5 January 2011. For CARD-FISH and TEM, one sponge individual (meaning a sponge associated to both shells of the bivalve *Arca noae*) was collected at the same location on 4 January 2012. For both collections samples were placed in plastic bags underwater to avoid contact with air and immediately transported to the laboratory. The sponge specimens were rinsed 3 times in calcium magnesium free - artificial seawater (CMF-ASW) to remove exogenous particles and loosely attached bacteria present in the sponge's aquiferous channels. Sponge tissue was processed 30 minutes after sampling to avoid possible modifications of the microbial community associated with the sponge during processing. The washed specimen collected in 2011 was frozen at –80°C for subsequent DNA extraction whereas the 2012 specimen was fixed immediately for CARD-FISH and TEM analysis (see below).

DNA extraction. Cleaned sponge fragments (2011 sample) were pooled (35 g total) and homogenized in two volumes of CMF-ASW using a Waring blender with 3 cycles of: 15 s at 22000 rpm, 30 s pause, 15 s again at 22000 rpm, with a 60 s pause in between each cycle. The homogenate was centrifuged for 5 min at 3000 rpm to pellet larger particles and sponge cells. The remaining sponge cells and bacteria in the supernatant were pelleted by centrifuging for 30 min at 8000 rpm. The pellet was washed twice by resuspending in 35 ml of CMF-ASW and centrifuging at 8000 rpm for 30 min. The final pellet was resuspended in 35 ml of CMF-ASW, filtered through GF/A glass fiber filters (1.6 µm nominal retention size) to remove remaining sponge

cells and centrifuged once more at 8000 rpm for 30 min. This pellet was frozen in 35% glycerol and stored at –80°C until further analysis.

To extract DNA, cells present in the pellet were disrupted by bead beating (3 pulses of 30 s at 25 Hz) using a model MM301 cell disruptor (Retsch, Germany) and 200 µm low-protein binding zirconium beads (OPS Diagnostics, Bridgewater, NJ, USA). The lysate was then gently mixed with an equal volume of guanidinium thiocyanate buffer⁴³. Nucleic acids were recovered using a standard phenol and chloroform extraction, and washed and concentrated in TE buffer using Centricon 30 microconcentrators (Amicon, Danvers MA).

16S rRNA gene library analysis. Extracted DNA was used as template for 16S rRNA gene amplification using modified universal primers targeting Bacteria, 27Fmod (5' AGRGTTTGATCMTGGCTCAG 3') and 1492Rmod (5' TACGGYTACCTTGT-TAYGACTT 3') as previously described⁴⁴. Amplification was performed in a 40 µL total-reaction volume with 1X Platinum *Taq* DNA polymerase buffer, 500 nM of each primer, 0.8 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 2 µg/ml BSA, 0.025 U/µl Platinum *Taq* DNA polymerase, and 200 ng of extracted DNA. PCR cycling was as follows: 94°C for 3 min, 27 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min 72°C for 2 min followed by 72°C for 10 min.

PCR products were run in a modified TAE agarose gel and purified with Ultrafree DNA columns (Millipore, Billerica, MA) using the manufacturer's protocol. Purified PCR products were cloned using the TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing using One Shot TOP 10® Electrocompetent Cells (Life Technologies) according to manufacturers instructions and plasmid purification was performed with the Montage Plasmid Miniprep 96 Kit (Millipore). Plasmid inserts were sequenced using the dideoxy-terminator reaction using the 907 reverse primer [5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3']⁴⁵ and the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Cycle sequencing products were cleaned using the Agencourt® CleanSeq® Dye-Terminator Removal kit (Beckman Coulter, Brea, CA) and run in an AB3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies).

Partial, raw sequences were assembled using 20 nucleotides minimum overlap and 99% maximum mismatches and visually edited using the gap4 program of the Staden package⁴⁶. Edited contigs were exported in fasta format including the number of reads

Table 2 | Summary of CARD-FISH protocol optimized for the detection of bacteria in marine sponge tissue sections. RT, room temperature

Stage	Step N°	Description
Fixation	1	Incubate sponge tissue in 4% buffered paraformaldehyde (4°C, 4 h)
	2	Wash 3 times in same phosphate buffer (RT)
	3	Dehydrate in 70% ethanol (4°C, 24 h)
Tissue Sectioning	4	Embed tissue samples in paraffin
	5	Cut 10 µm thick sections with a microtome onto polysilane-coated microscope slides, leave to dry 3 h at 35°C
Deparaffinization	6	Incubate slides twice in xylene (RT, 10 min each)
	7	Rehydrate in an ethanol series (95%, 80%, 70%; 10 min each)
Inactivation of endogenous peroxidases	8	Incubate in 0.2 M HCl (RT, 12 min)
	9	Incubate in 20 mM Tris.HCl (RT, 10 min)
Permeabilization 1	10	Cover tissue sections with proteinase K, incubate in humid chamber (37°C, 5 min)
	11	Wash slides in 20 mM Tris.HCl (RT, 10 min), air dry
Permeabilization 2	12	Dip slides in 0.1% low melting point agarose and air dry (10 min)
	13	Cover tissue sections with lysozyme, incubate in humid chamber (37°C, 1 h)
	14	Wash slides in milliQ water (1 min)
	15	Dehydrate in 96% ethanol (1 min) and air dry
Hybridization	16	Cover tissue sections with hybridization buffer containing probe at 1/20 dilution of working solution (1 probe per slide)
	17	Insert slides into prepared humid chambers
	18	Incubate at 35°C for 3 h
	19	Wash slides in prewarmed wash buffer (37°C, 15 min)
CARD	20	Incubate slides in 1X PBS (RT, 15 min)
	21	Dab around tissue sections to remove excess buffer but do not let sections dry
	22	Incubate tissue sections with substrate mix (1/200 dilution of tyramide in amplification buffer) in humid chamber in the dark (37°C, 20 min)
	23	Wash slides in 1X PBS (RT, 15 min)
	24	Wash slides in milliQ (1 min) and air dry
	25	Counterstain with DAPI using mounting medium supplemented with DAPI

RT, Room temperature.



per contig as weights, and chimeric sequences were eliminated by using a stringent chimera checking pipeline consisting of uchime⁴⁷, Bellerophon⁴⁸ and by querying the sequences against a curated version of the Silva database SSURF_111_SILVA_NR_98_26_07 (<http://www.arb-silva.de/>) using blastn (see Supplementary Information for detailed parameters used). Non-chimeric sequences resulting from this pipeline were filtered for clones of planktonic origin by blastn queries against a local database including 1493 OTUs from 37, 860 16S rRNA PCR library sequences from the Global Ocean Sampling project plus 8,471 marine bacterial 16S rRNA sequences obtained from the ribosomal database project dataset, and graciously provided by S. Yooseph.

The 16S rRNA sequences of the clones used in this study have been deposited in the GenBank database under accession numbers KC492587–KC492611 and KC492698–KC492704.

Phylogenetic analysis. Clone sequences classified as non-chimeric and non-planktonic were fully sequenced using primers 907R and 785F (5' GGATAGATACCCCTGGTAGT 3'), individually assembled using gap4, and exported. These sequences were aligned using the *mothur*⁴⁹ and imported into the SSURF_111_SILVA_18_07_12 database of the Silva project⁵⁰ using the ARB software⁵¹. Phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining using the phylo package V3.6⁵² and by Bayesian analysis using Mr Bayes v3.2.1×64⁵³. For both methods, the aligned clone sequences and reference sequences from the Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria were filtered using an 1112 bp majority filter.

454-pyrosequencing analyses. The PCR products used to construct the clone library were used as template for 454 pyrosequencing by the Research and Testing Laboratory (Lubbock, TX) according to a standard multiple protocol of this sequencing facility and described by Dowd and coworkers⁵⁴. Briefly a PCR step (30 cycles) with a HotStart HiFidelity Polymerase and primers 28F (5' TTGATCCTGGCTCAG 3') and 519R (5' GTNTTACNGCGGCKGCTG 3') was performed in order to amplify the hypervariable V1–V3 region of the 16S rRNA gene. Tag-encoded FLX amplicons were sequenced on the Roche 454 FLX sequencer using Titanium (Roche) reagents. Multiplex raw sff files were analyzed using a hybrid analysis pipeline. In brief, denoising was done by AmpliconNoise V1.25⁵⁵ implemented in Qiime V1.5⁵⁶ and rather than using chimera analysis by Perseus, *de novo* chimera detection and removal was done by using the uchime⁴⁷ module of Usearch V5.0⁵⁷ followed by the same analyses as for the clone library (details of parameters and commands in Supplementary Information). Non-chimeric were unweighted and grouped into OTUs using uclust with 97% sequence identity. OTU representatives were selected based on abundance. OTUs of planktonic origin were identified by blastn searches as above.

Pyrosequencing sequence reads representing the 86 OTUs have been deposited in the GenBank database under accession numbers KC492612–KC492697.

Oligonucleotide probe design. The specific oligonucleotide probe BET467 targeting the prevalent betaproteobacterial sequences in the clone library was designed using the probe design tool of the ARB software package⁵¹. The specificity of the probe sequence was confirmed by the probe_match tool of ARB, the probe match tool of Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) and blastn searches. Only 3 non-target sequences in the probe_match tool of ARB database had less than 3 mismatches with this specific probe. As the 16S rRNA target region was potentially inaccessible⁵⁸, two unlabeled helper oligonucleotides H-485 and H-446 were also designed. Oligonucleotide sequences of probes used, labeling and details are shown in Table 1. All probes were synthesized by ThermoFisher Scientific (Germany).

Catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH). A summary of all the steps performed for CARD-FISH is given in Table 2. To determine the distribution of the bacteria in the sponge, 10 tissue samples of *C. crambe*, from different anatomic locations of two sponges specimens (about 1 cm³) were fixed as in steps 1–3 (Table 2), embedded in paraffin (at different orientations), cut into 10 µm thick sections with a microtome (MICROM HM340E; Thermo Scientific) and mounted on polysilane-coated slides (steps 4 and 5⁵⁹). Subsequent sample treatment and CARD-FISH was carried out according to a previously described protocol²⁷ with some modifications. After drying, slides were deparaffined (steps 6 and 7). A step to inactivate endogenous peroxidases was performed, followed by a permeabilization step where a solution of Proteinase K (0.5 µg/ml) was added to tissue sections. A lysozyme permeabilization step was not included in the protocol from Blazejak and coworkers, but since this step has been shown to improve significantly CARD-FISH signals⁶⁰ our tissue sections were subject to lysozyme permeabilization steps [10 mg ml^{−1} lysozyme (Fluka) in 0.05 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl (pH8.0) (step 12–15)].

Hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH7.5], 10% dextran sulfate, 0.02% sodium dodecyl sulfate [SDS], 55% formamide [Sigma] and 1% Blocking Reagent [Roche]) - probe mixtures were added to the tissue sections on slides, and incubated in hybridization chambers prepared with a 55% formamide-water mixture at 35°C for 3 h. Due to the absence of a cultured representative of the targeted betaproteobacterium, the optimum formamide concentration to be used for the specific probe BET467 was determined by carrying out hybridizations with the sponge tissue sections, varying formamide concentrations (50%, 55%, 60%), and selecting the highest formamide concentration before a reduction in fluorescence signal was observed. This was determined to be 55%. Hybridizations for the BET467 probe were carried out as above and also included the helper probes H-485 and H-446

at a concentration of 2.5 ng/µl. Following hybridization, the slides were prepared as in steps 20–25 (Table 2). Washing buffer contained 5 mM EDTA [pH 8], 20 mM Tris-HCl [pH 8], 0.01% [w/v] sodium dodecyl sulfate and 13 mM NaCl. The CARD substrate mix was prepared by mixing amplification buffer (10% [w/v] dextran sulfate, 2 M NaCl, 0.1% [w/v] blocking reagent, in 1X PBS [pH 7.6]) with a freshly prepared H₂O₂ solution (0.15% in 1X PBS) at a ratio of 100:1. Mounting medium contained Citifluor and Vectashield at a 4:1 ratio with DAPI at 0.5 µg/ml.

Slides were observed under a model BX61 microscope (Olympus) equipped with DAPI (U-MNU2) and FITC (U-N41001 HQIF) filter sets. Images analyses were performed using a model Olympus DP72 (Olympus) camera system and Cell^A (Olympus) imaging software. To obtain a rough estimate of bacterial cell numbers in the sponge tissue, 20 square zones of 20 µm² were selected. In each of these zones, the Betaproteobacteria signals were counted from the specific probe signals, and total bacterial cells and sponge nuclei were counted from the corresponding DAPI image.

Transmission electron microscopy. TEM was performed according to Uriz and collaborators⁶¹ with minor modifications. Briefly, small samples of sponge tissue (3–4 mm²), were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 (osmolality adjusted to 980 mOsm with sucrose), washed in the same buffer at room temperature, and post-fixed for 1 hour in 1% osmium tetroxide. The samples were dehydrated in an ethanol-graded series (70%; 95%; 100%) and embedded in Epon 812 (EMS). Ten sub samples of *C. crambe* tissue (two sponges specimens) were prepared and embedded with different orientation. Contrasted ultra thin sections (produced using an ultramicrotome (Ultracut R Leica)) were observed at 80 kV on a transmission electron microscope (Hitachi, H7500, Japan).

- Vacelet, J. & Donadey, C. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 301–314 (1977).
- Hentschel, U. *et al.* Microbial diversity of marine sponges. *Prog. Mol. Subcell Biol.* **37**, 59–88 (2003).
- Hentschel, U., Usher, K. M. & Taylor, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**, 167–177 (2006).
- Schmitt, S. *et al.* Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME J.* **6**, 564–576 (2012).
- Simister, R. L., Deines, P., Botté, E. S., Webster, N. S. & Taylor, M. W. Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environ. Microbiol.* **14**, 517–524 (2012).
- Reiswig, H. M. Partial Carbon and Energy Budgets of the Bacteriosponge *Verohigia fistularis* (Porifera: Demospongiae) in Barbados. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **273**, 273–293 (1981).
- Kamke, J., Taylor, M. W. & Schmitt, S. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *The ISME J.* **4**, 498–508 (2010).
- Isles, E. C. *et al.* Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiol. Ecol.* **83**, 232–241 (2013).
- Simister, R., Taylor, M. W., Rogers, K. M., Schupp, P. J. & Deines, P. Temporal molecular and isotopic analysis of active bacterial communities in two New Zealand sponges. *FEMS Microbiol. Ecol. doi: 10.1111/1574-6941.12109* (2013).
- Hentschel, U. *et al.* Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4431–4440 (2002).
- Piel, J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 519–538 (2004).
- Faulkner, D. J. Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Nat. Prod. Rep.* **17**, 1–6 (2000).
- Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **88**, 93–101 (2001).
- Kim, T. K. & Fuerst, J. A. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environ. Microbiol.* **8**, 1460–1470 (2006).
- Kashman, Y. *et al.* Ptilomycin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8925–8926 (1989).
- Jares-Erijman, E. A., Ingram, A. L., Carney, J. R., Rinehart, K. L. & Sakai, R. Polycyclic guanidine-containing compounds from the mediterranean sponge *Crambe crambe*: the structure of 13, 14, 15-isocrambescidin 800 and the absolute stereochemistry of the pentacyclic guanidine moieties of the crambescidins. *J. Org. Chem.* **58**, 4805–4808 (1993).
- Jares-Erijman, E. A., Sakai, R. & Rinehart, K. L. Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. *J. Org. Chem.* **56**, 5712–5715 (1991).
- Tavares, R. *et al.* Isolation of Crambescidin 800 from *Monanchora arbuscula* (Porifera). *Biochem. Syst. Ecol.* **22**, 645–646 (1994).
- Patil, A. D. *et al.* Batzelladines F–I, novel alkaloids from the sponge *Batzella sp.*: Inducers of p56lck-CD4 dissociation. *J. Org. Chem.* **62**, 1814–1819 (1997).
- Harbour, G. C. *et al.* Ptilocaulin and isoptilocaulin, antimicrobial and cytotoxic cyclic guanidines from the Caribbean sponge *Ptilocaulis aff. P. spiculifer* (Lamarck, 1814). *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5604–5606 (1981).
- Snider, B. B. & Shi, Z. Biomimetic synthesis of the pentacyclic nucleus of ptilomycin A. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 549–557 (1994).
- Berlinck, R. G. S. *et al.* Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. *J. Nat. Prod.* **56**, 1007–1015 (1993).



23. Becerro, M. A., Lopez, N. I., Turon, X. & Uriz, M. J. Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J Exp Mar Biol Ecol* **179**, 195–205 (1994).
24. Uriz, M. J., Becerro, M. A., Tur, J. M. & Turon, X. Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Mar Biol* **124**, 583–590 (1996).
25. Sarà, M. Associazione fra Poriferi e alghe in acque superficiali del litorale marino. *Ricerca scient* **36**, 277–282 (1966).
26. Thiel, V., Neulinger, S. C., Staufenberger, T., Schmaljohann, R. & Imhoff, J. F. Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 47–63 (2007).
27. Blazejak, A., Erséus, C., Amann, R. & Dubilier, N. Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (Oligochaeta) from the Peru margin. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1553–1561 (2005).
28. Uriz, M. J., Turon, X. & Becerro, M. A. Morphology and ultrastructure of the swimming larvae of *Crambe crambe* (Demospongiae, Poecilosclerida). *Invert Biol* **120**, 295–307 (2001).
29. Yooseph, S. *et al.* Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature* **468**, 60–66 (2010).
30. Peek, A. S., Vrijenhoek, R. C. & Gaut, B. S. Accelerated evolutionary rate in sulfur-oxidizing endosymbiotic bacteria associated with the mode of symbiont transmission. *Mol Biol Evol* **15**, 1514–1523 (1998).
31. Moran, N. A. Tracing the evolution of gene loss in obligate bacterial symbionts. *Curr Opin Microbiol* **6**, 512–518 (2003).
32. Suzuki, M. T., Beja, O., Taylor, L. T. & DeLong, E. F. Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. *Environ Microbiol* **3**, 323–331 (2001).
33. Bensaadi-Merchernek, N., Salvado, J. C., Cagnon, C., Karama, S. & Mouchès, C. Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S-5S rRNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prokaryotic parasite of insect gonads. *Gene* **165**, 81–86 (1995).
34. Rurangirwa, F. R., Brayton, K. A., McGuire, T. C., Knowles, D. P. & Palmer, G. H. Conservation of the unique rickettsial rRNA gene arrangement in *Anaplasma*. *IJSEM* **52**, 1405–1409 (2002).
35. Usher, K. M., Kuo, J., Fromont, J. & Sutton, D. C. Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* **461**, 9–13 (2001).
36. Sharp, K. H., Eam, B., Faulkner, D. J. & Haygood, M. G. Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge *Corticium sp.* *Appl Environ Microbiol* **73**, 622–629 (2007).
37. Schmitt, S., Angermeier, H., Schiller, R., Lindquist, N. & Hentschel, U. Molecular Microbial Diversity Survey of Sponge Reproductive Stages and Mechanistic Insights into Vertical Transmission of Microbial Symbionts. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7694–7708 (2008).
38. Selvin, J., Ninawe, A. S., Seghal Kiran, G. & Lipton, A. P. Sponge-microbial interactions: Ecological implications and bioprospecting avenues. *Crit Rev Microbiol* **36**, 82–90 (2010).
39. Bretting, H. & Königsmann, K. Investigations on the lectin-producing cells in the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). *Cell Tissue Res* **201**, 487–497 (1979).
40. Thompson, J. E., Barrow, K. D. & Faulkner, D. J. Localization of two brominated metabolites, aerothionin and homo-aerothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongia thiona*). *Acta Zool* **64**, 199–210 (1983).
41. Fan, L. *et al.* Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. *PNAS* **109**, E1878–E1887 (2012).
42. Siegl, A. *et al.* Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *ISME J* **5**, 61–70 (2011).
43. Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L. & Hill, R. T. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 434–444 (2001).
44. Vergin, K. L. *et al.* Screening of a Fosmid Library of Marine Environmental Genomic DNA Fragments Reveals Four Clones Related to Members of the Order Planctomycetales. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3075–3078 (1998).
45. Muyzer, G. *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In *Kluwer Academic* (ed Akkermans, A., Van Elsland, J. & De Bruijn, F.) **3.4.4**, 1–27 (Dordrecht, 1998).
46. Bonfield, J. K., Smith, K. F. & Staden, R. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* **23**, 4992–4999 (1995).
47. Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200 (2011).
48. Huber, T., Faulkner, G. & Hugenholtz, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**, 2317–2319 (2004).
49. Schloss, P. D. *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537–7541 (2009).
50. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**, D590–D596 (2013).
51. Ludwig, W. *et al.* ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**, 1363–1371 (2004).
52. Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle (2005).
53. Ronquist, F. *et al.* MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol* **61**, 539–542 (2012).
54. Dowd, S. E. *et al.* Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS One* **3**, e3326 (2008).
55. Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J. & Turnbaugh, P. J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC bioinformatics* **12**, 38 (2011).
56. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**, 335–336 (2010).
57. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461 (2010).
58. Fuchs, B. M., Glöckner, F. O., Wulf, J. & Amann, R. Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3603–3607 (2000).
59. Sauzet, S. *et al.* Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen Comp Endocrinol* **157**, 186–195 (2008).
60. Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3094–3101 (2002).
61. Uriz, M. J., Turon, X. & Becerro, M. A. Silica deposition in Demosponges: spiculogenesis in *Crambe crambe*. *Cell Tissue Res* **301**, 299–309 (2000).
62. Amann, R. *et al.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1919–1925 (1990).
63. Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W. Optimizing fluorescent in situ hybridization of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**, 136–143 (1993).
64. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst and Appl Microbiol* **15**, 593–600 (1992).
65. Stahl, D. A. & Amann, R. Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (eds Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.) 205–248 (Wiley & Sons, 1991).

Acknowledgements

We thank the OOB diving team for collecting the sponge specimens and Shibu Yooseph (JCVI) for providing us with a database of planktonic rRNA genes associated with his previous publication. Molecular biology, and DNA sequencing analyses were performed using the Marine Biodiversity and Biotechnology platform (Bio2Mar) and microscopy analysis using the Cytometry and Imaging platform (<http://www.obs-banyuls.fr/pci/index.php>) both at OOB. We thank Olivier Thomas (Univ. Nice), Detmer Sipkema (Univ. Wageningen), Maria-Jesús Uriz (CSIC Blanes), Nataly Bontemps and Bernard Banaigs (Univ. Perpignan) and Thierry Perez (Univ. Marseille) for suggestions to the experimental work and very fruitful discussions. We thank the UPMC doctoral school 392 (Diversity of Life) for its doctoral fellowship to Julie Croué.

Author contributions

Experiment concept and design: M.T.S., P.L. Laboratory work: J.C., N.J.W., M.L.E., L.I. Data analysis: M.T.S., J.C., N.J.W., M.L.E. Wrote the first draft of the manuscript: M.T.S., J.C., N.J.W. The manuscript was written and approved by all authors.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Croué, J. *et al.* A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*. *Sci. Rep.* **3**, 2583; DOI:10.1038/srep02583 (2013).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0>

Chapitre 3

Etude de la diversité microbienne
cultivable associée à l'éponge
méditerranéenne *Crambe crambe*

Croué, J. ; Intertaglia L. ; Hogrel, G. ; Lebaron, P. et M.T. Suzuki

Article en préparation

Mots clés : *Crambe crambe* / bactéries associées / procédure d'acclimatation / milieux
sélectifs/ culture en dilution

Introduction

Les études attribuant la biosynthèse des métabolites secondaires bioactifs extraits des éponges marines aux bactéries associées sont de plus en plus nombreuses (Bewley et Faulkner, 1998 ; Lee et al., 2001 ; Proksch et al., 2002 ; Taylor et al., 2007). Pour exemple, la synthèse de l'alcaloïde Alteramide A isolé de l'éponge *Halichondria okadai* a été attribuée à la bactérie *Alteromonas sp.* (Shigemori et al., 1992), celle des antibiotiques polybromés isolés de l'éponge *Dysidea herbacea* à des cyanobactéries endosymbiotiques appartenant à l'espèce *Oscillatoria spongelliae* (Unson et Faulkner, 1993 ; Unson et al., 1994), celle des métabolites antitumoraux onnamide et théopédérine à un micro-organisme associé à l'éponge *Theonella swinhoei* (Bewley et al., 1996 ; Piel et al., 2004b). Il est cependant, dans la majorité des cas, très difficile d'affirmer l'implication d'une bactérie dans la synthèse d'un ou plusieurs métabolites secondaires extraits d'éponges marines. Différentes techniques sont utilisées, directes par culture des micro-organismes symbiotiques potentiellement producteurs ou indirectes par séparation des différents types cellulaires constitutifs des éponges et localisation des métabolites secondaires par analyse chimique des différentes fractions obtenues (Unson et al., 1994 ; Bewley et al., 1996 ; Faulkner et al., 1999 ; Roué et al., 2010), ou bien par analyse du métagénome des micro-organismes symbiotiques afin de rechercher les gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires (Piel et al., 2004a ; Fieseler et al., 2006).

Peu d'études rapportent l'isolement de micro-organismes symbiontes responsables de la production de métabolites secondaires extraits des tissus de leurs éponges hôtes. Il est noté l'isolement d'un *Micococcus sp.* à partir des tissus de l'éponge *Tedania ignis* produisant des dicétopipérazines (Stierle et al., 1988) ; d'un *Vibrio sp.* à partir des tissus

de l'éponge *Dysidea sp.* produisant des bromodiphenylethers (Elyakov et al., 1991 ; Lee et al., 2001) ; ou encore d'une actinobactérie *Micromonospora sp.* des tissus de l'éponge *Haliclona sp.* (Hill et al., 2004) produisant la manzamine A, alcaloïde à l'activité anti-tumorale (Sakai et al., 1986) et antimalariale (Ang et al., 2000).

Les techniques de culture standard sont souvent peu adaptées à l'étude de la diversité bactérienne marine. En effet, moins de 1% des bactéries marines observées par marquage direct dans un échantillon d'eau de mer sont cultivables par des méthodes classiques et les bactéries associées aux éponges ne sont pas des exceptions avec moins de 14% de la diversité bactérienne totale qui est cultivable sur ces milieux de culture (Santavy et al., 1990 ; Friedrich et al., 2001 ; Webster et al., 2001b ; Sipkema et al., 2011 ; Schippers et al., 2012). La plupart des études de culture utilisent des milieux développés pour l'isolement de bactéries aérobies planctoniques. Cependant le micro-environnement du mésohyle, où sont majoritairement localisées les bactéries associées à ces éponges est significativement différent de l'environnement naturel dans lequel vivent ces invertébrés (Sipkema et al., 2011). Cela rend ces milieux peu adaptés à l'isolement des bactéries endosymbiotiques. Par exemple, par la présence de sidérophores (chélateurs de fer sécrétés notamment par les micro-organismes), les concentrations en fer sont plus importantes au sein du mésohyle que dans l'eau de mer environnante (Guan et al., 2000). Les éponges comme de nombreux autres invertébrés marins produisent également de l'ammonium (comme déchets de leur métabolisme), induisant une plus forte concentration de cet ion au sein de leurs tissus (Brusca et Brusca, 1990). Des conditions anoxiques sont également retrouvées au sein du mésohyle lorsque l'éponge cesse de filtrer l'eau de mer environnante (Hoffmann et al., 2005 ; Hoffmann et al., 2008). Des lectines, protéines intervenant dans le processus de

réagrégation cellulaire (Müller et al., 1979) et dans l'établissement et le maintien de la symbiose entre l'éponge et les bactéries sont présentes au sein des tissus d'éponge (Müller et al., 1981) ; ainsi que des acyles homosérines lactones (Taylor et al., 2004a), « molécules signales » impliquées dans la communication inter-bactérienne (Fuqua et al., 2001) et dans la colonisation de nombreux macro-organismes.

Il est ainsi possible d'augmenter la « culturabilité » de nombreuses souches bactériennes présentes au sein des éponges par la mise en place de techniques sélectives mimant la composition et les conditions *in vivo* retrouvées au sein du mésohyle. Pour exemple, l'utilisation de milieux supplémentés en extraits d'éponges, en acyles homosérines lactones (Sipkema et al., 2011), ainsi que des conditions d'incubation micro-aérophiles ou anaérobiques (Lavy et al., 2014) ont permis une augmentation du nombre d'isolats bactériens obtenus à partir des tissus d'éponge. Il a également été montré que l'isolement de micro-organismes associés aux spongiaires était favorisé lors de l'utilisation de milieux de culture oligotrophes (Muscholl-Silberhorn et al., 2008). Récemment, l'utilisation d'une chambre de diffusion placée au sein du mésohyle de *Rhobdastrella globostella* a elle aussi permis l'isolement de souches difficilement cultivables (Steinert et al., 2014).

L'éponge de cette étude, *Crambe crambe* (Schmidt, 1862) (Poecilosclerida), encroûtante rouge-orangée largement répandue en Méditerranée, est connue pour sa très forte toxicité. De nombreux alcaloïdes guanidiniques pentacycliques (PGAs), les crambescidines ont été isolés de celle-ci (Jares-Erijman et al., 1991 ; Berlinck et al., 1993 ; Bondu et al., 2012). Les voies de biosynthèse de ces PGAs ne sont pas encore

déterminées. Il est proposé que leur structure suggère une biogénèse de type polycétide (Snider et Shi, 1993 ; Berlinck et al., 2008 ; Makarieva et al., 2012) ce qui entrainerait l'implication de polycétides-synthases (PKS) dans les voies de biosynthèse de ces composés. Cependant cette proposition est très largement controversée (Communication personnelle de Olivier Thomas). Il est reconnu que les PKS sont retrouvées de façon prédominante chez les bactéries (Bode et Müller, 2005) ainsi cette hypothèse de biosynthèse suggèrerait l'implication des micro-organismes associés à *C. crambe*. Si la présence de micro-organismes associés à cette éponge à longtemps été controversée, il a récemment été démontré que la communauté bactérienne associée à *C. crambe* était largement dominée par une unique OTU (74% des séquences totales obtenues par pyroséquencage-454 de l'ARNr16S total) correspondant à une bêtaprotéobactérie (Croué et al., 2013).

Au cours de cette étude, différentes techniques de cultures ont été mise en place pour isoler les bactéries retrouvées au sein des tissus de *C. crambe* et plus particulièrement la bêtaprotéobactérie majoritaire dont : (1) une procédure d'acclimatation. Cette technique développée par Hahn et collaborateurs (2003) consiste à acclimater progressivement les bactéries présentes dans l'inoculum aux conditions de culture artificielle de laboratoire et cela par l'augmentation concomitante et progressive de la température d'incubation et de la concentration en nutriments additionnés à l'inoculum. (2) Différents milieux sélectifs ont été testés pour isoler des bactéries ammonium-oxydantes « AOB », à bas pH et à basse salinité. En effet, des analyses phylogénétiques (données non montrées) de la bêtaprotéobactérie majoritairement associée à *C. crambe* montrent qu'elle serait relativement proche de bactéries ammonio-

oxydantes. (3) La culture en dilution avec ajout de jus de *C. crambe* au milieu de culture a finalement été testée (Sipkema et al., 2011).

Cette étude vient compléter, celle récemment menée par Oztürk et collaborateurs (2013), qui par l'utilisation de 16 milieux de culture solides et liquides, distincts par leurs compositions et leurs concentrations en nutriments, ont étudié la diversité bactérienne cultivable associée à *C. crambe* afin de rechercher des micro-organismes symbiotiques qui possèdent des gènes spécifiques pouvant intervenir dans la synthèse de composés halogénés (halogénases dépendantes du FADH₂).

Matériel et Méthodes

Echantillonnage

Quatre spécimens de *C. crambe* (Schmidt, 1862) ont été collectés par plongée sous-marine dans la baie de Banyuls sur Mer (Méditerranée) (48° 28'823N – 3° 08'038 E) à une profondeur d'environ 12 mètres le 20 Janvier 2010 (pour la procédure d'acclimatation) et le 21 Avril 2011 (pour les essais de culture en dilution et sur milieux sélectifs). Les tissus d'éponges ont été placés sous l'eau dans des sacs plastiques afin d'éviter tout contact avec l'air et transportés immédiatement au laboratoire. Le traitement des tissus a été réalisé le plus rapidement possible afin de limiter toute modification éventuelle de la communauté bactérienne associée à cette éponge. Le nettoyage des tissus a été effectué selon le même protocole que celui qui a été utilisé pour l'étude de caractérisation de la diversité bactérienne associée à *C. crambe* (Chapitre 2). Brièvement, les tissus ont été rincés à 3 reprises à l'aide d'eau de mer artificielle enrichie en calcium et magnésium (CMF-ASW). Vingt grammes de tissus (poids humide) ainsi nettoyés ont été homogénéisés dans deux volumes de CMF-ASW à l'aide d'un « waring blender » [(15s max speed 22000rpm – 30s stop – 15s max speed) x 3 fois]. Le mélange homogène ainsi obtenu a ensuite été centrifugé 5 min à 3000 rpm afin d'éliminer les particules exogènes. Puis le surnageant a lui été centrifugé 30 min à 8000 RPM pour culoter la fraction enrichie en bactéries. Cette fraction, nettoyée à deux reprises, a été reprise dans 35 mL de CMF-ASW. La suspension cellulaire obtenue a été utilisée immédiatement comme inoculum pour les différentes techniques de culture testées : la procédure d'acclimatation, la culture sur milieux spécifiques et l'essai de culture en dilution.

Conditions de culture

A- Procédure d'acclimatation

10 mL d'inoculum préparé comme précédemment, ont été soumis à une augmentation progressive de la température de 2°C par jour à partir de la température de l'eau de mer au moment de l'échantillonnage (14°C) et jusqu'à 20°C ; ainsi qu'à une augmentation concomitante de la concentration en nutriments apportés au milieu (Figure 15).

Pour chaque condition, une série de dilutions (10^{ème} (N⁻¹), 100^{ème} (N⁻²) et 1000^{ème} (N⁻³)) a étéensemencée (par la méthode des stries) en triplicat sur boîte de pétri contenant un milieu solide moins riche, le milieu Marine R₂A 1:5 (MR₂A 1:5) (Difco R₂A agar dans un litre d'eau de mer filtrée et diluée à 75%). Les milieux de culture solides ainsiensemencés ont été incubés durant 15 jours à 20 degrés à l'obscurité.

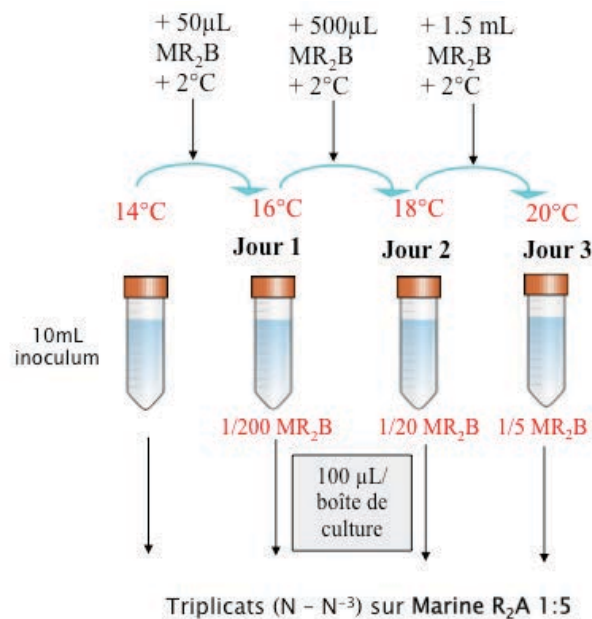


Figure 15. Représentation schématique de la procédure d'acclimatation expérimentée.

B- Culture sur milieux spécifiques

Quatre milieux de culture de composition (pH et salinité) plus proche du microenvironnement du mésophyle ont été utilisés : MR₂A 1:5 (Difco BD® R₂A Agar), MR₂A 1:5 à salinité réduite (15g NaCl/L), MR₂A 1:5 avec pH ajusté à 6.0, MR₂A à 1:5 salinité réduite (15g NaCl/L) et le pH ajusté à 6.0. Pour isoler des procaryotes ammonio-oxydatrices (AOB) (cf. p 76), nous avons utilisé un milieu AOB adapté de celui de Koops et collaborateurs (Koops et al., 1991). Le milieu contient pour un litre d'eau de mer filtrée et diluée à 75% : 0.535 g NH₄Cl, 0.054 g KH₂PO₄, 0.074g KCl, 0.049 g MgSO₄.7H₂O, 0.147 g CaCl₂.2H₂O, 0.584 g NaCl, 15 g Agar et 0.1 g de cycloheximide. Quatre conditions ont été comparées : le milieu AOB ci-dessus, le milieu AOB à salinité réduite (15g NaCl/L) le milieu AOB avec pH ajusté à 6 et milieu AOB à salinité réduite (15g NaCl/L) avec pH ajusté à 6.0. Les boîtes de petri ont ainsi étéensemencées en triplicat avec 100 µL d'homogénat sans acclimatation préalable (sans dilution et après dilution au 10^{ème} (N⁻¹), 100^{ème} (N⁻²) et 1000^{ème} (N⁻³) de l'homogénat) puis incubées pendant deux semaines à 20°C à l'obscurité.

C- Culture en dilution

Pour la culture en dilution, le nombre total de bactéries présentes dans l'inoculum a été estimé par cytométrie de flux à 1.2 x10⁹ bactéries/mL. L'inoculum a ensuite subi une série de dilutions à l'aide d'eau de mer filtrée stérile afin d'obtenir une concentration bactérienne de 1 à 5 bactéries/mL. Dix microplaques de 48 puits (BD Falcon) ont ensuite été remplies (1 mL/puits) et incubées à 20°C dans l'obscurité.

Dans cinq de ces microplaques, 120 µL de jus d'éponge stérile préparés par dilution de l'inoculum au dixième à l'aide d'eau de mer stérile puis par filtrations successives à

travers un filtre GFA (1.6 μm), puis un filtre GFF (0.8 μm) et finalement une cartouche Sterivex® 0.2 μm , ont été ajoutés à chaque puits. Une éventuelle croissance bactérienne dans ces puits a été suivie par cytométrie de flux après 2 mois puis 2 ans d'incubation.

Isolement et conservation des souches bactériennes

Dénombrement des colonies bactériennes – Procédure d'acclimatation

La détermination des Unités Formant les Colonies ou UFC totales a été réalisée par dénombrement des colonies présentes pour chaque temps (T_0 à T_3) et pour chaque dilution (N à N^{-3}).

Isolement des bactéries

Pour chaque traitement ainsi que pour chaque temps d'incubation dans le cas de la procédure d'acclimatation, les colonies (présentes sur les triplicats aux trois dilutions) ont été classées selon leur morphotype. En vue de leur purification, trois colonies d'un même morphotype ont été sub-cultivées à 3 reprises: 2 fois sur le milieu original puis sur un milieu Marine Agar 2216 (MA, Difco). Ainsi il est possible que plus de trois colonies d'un même morphotype soient sub-cultivées si celui-ci est présent à différents temps d'incubation ou différents traitements. La probabilité d'isolement d'un morphotype est alors dépendante d'une part de son abondance et d'autre part de sa croissance dans différentes conditions et temps d'incubation. Les colonies ainsi purifiées ont été inoculées en milieu liquide dans du Marine Broth 2216 (MB, Difco) sous agitation à 100 RPM à 25°C pendant 48 heures à l'obscurité. Afin de conserver les souches vivantes, chaque suspension bactérienne obtenue a été répartie dans 2 tubes l'un contenant du glycérol à 35% (500 μL de suspension bactérienne + 500 μL glycérol 70%) et l'autre du diméthylsulfoxyde ou DMSO à 5% (950 μL de suspension + 50 μL de DMSO).

100%). Le tout a ensuite été placé dans un surgélateur à -80°C (Hubalek, 2003). Parallèlement, un contrôle systématique de pureté pour chaque souche a été effectué sur boîte de Pétri.

Identification des souches bactériennes : amplification et séquençage de l'ARNr 16S

Amplification du gène codant l'ARN ribosomique 16S par réaction PCR (Polymerase Chain Reaction)

A partir des colonies issues du contrôle de pureté, une faible quantité de biomasse a été prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile et re-suspendue dans 50 µL d'eau MilliQ filtrée sur 0.22 µm et stérilisée. L'extraction d'ADN génomique pour chaque isolat a été réalisée par choc thermique en plongeant successivement (3 fois) les tubes dans de l'azote liquide puis une minute dans de l'eau bouillante. Pour certaines souches réfractaires à ce protocole, une méthode d'extraction d'ADN génomique a été réalisée avec le kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega).

L'amplification du gène ribosomique 16S par la PCR a été conduite dans un volume total pour une réaction de 25µL contenant : 1X Tampon, 2.0 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂ 0.4 µM Amorces SaDir (5' -AGAGTTTGATCATGGCTCAG- 3' position 8 à 28 de l'ARNr16S d'*E. coli*) et S17rev (5' -GTTACCTTGTTACGACTT- 3' position 1493-1509 de l'ARNr16S d'*E. coli*) (Agogue et al., 2005), 0,02U/µL de l'enzyme Platinum *Taq* DNA polymérase (Invitrogen) et 1 µL de l'extrait brut. Le cycle PCR a été réalisé dans un Thermocycleur ABI VERITI (Applied Biosystems) avec les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 1 minute, 35 cycles de 94°C pendant 1 minute, 50°C pendant 1 minute et 72°C pendant 2 minutes, et élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Séquençage de l'ARNr 16S

Les échantillons ainsi préparés ont ensuite été envoyés à une société spécialisée (MacroGen Inc, www.macrogen.com/).

Traitement et analyse des séquences obtenues en vue de l'identification des souches

Tous les résultats des séquences (fichiers .ab1) ont été traités avec le logiciel pregap 4 et gap4 du package « Staden ». Les séquences identiques ont été groupées en utilisant les outils d'assemblage de gap4, pour cela nous avons défini des souches appartenant au même phylotype lorsque leur pourcentage de similarité était de 100% sur la totalité du fragment chevauché. Afin d'identifier les différents isolats, le programme blastn du logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) a été utilisé pour comparer les séquences avec la base de données *nt* de GenBank. Les souches ont été considérées comme appartenant à une même espèce quand le pourcentage d'identité blastn était supérieur à 97% sur plus de 98% de la longueur de la séquence et à un même genre quand le pourcentage d'identité blastn était supérieur à 95% sur plus de 98% de la longueur de la séquence. Les séquences obtenues ont aussi été comparées à des données de séquences brutes obtenues par pyroséquencage-454 de la communauté bactérienne associée à *C. crambe* (Croué et al., 2013) en utilisant blastn.

Résultats

a- Diversité des bactéries cultivables isolées à partir de l'éponge *C. crambe* par la mise en place d'une procédure d'acclimatation.

Diversité des bactéries cultivables isolées

Au total 64 souches bactériennes ont été isolées à partir des tissus de *C. crambe* sur le milieu MR₂A 1/5 durant la procédure d'acclimatation (Tableau 3). *Staphylococcus epidermidis* a été retrouvé (12 000 UFC/mL) à T₃ dans 2 boîtes à la dilution 1:100. En raison de son absence dans des dilutions plus faibles, ces souches ont été considérées comme des contaminants, et ont été exclues de l'analyse. Les souches isolées au cours de cette étude appartiennent aux Phyla *Proteobacteria* (90,625%), *Actinobacteria* (6,25%) et *Firmicutes* (3,125%) (Tableau 3). Chez les Protéobactéries, la classe comportant le plus de souches est celle des Alphaprotéobactéries avec 37 isolats. La bêtaprotéobactérie symbionte majoritaire de *C. crambe* et décrite par Croué et collaborateurs (Croué et al., 2013) n'a pas été isolée, et plus généralement aucune bêtaprotéobactérie. Aucune des séquences d'isolats n'a été retrouvée parmi les données de pyroséquençage traitées (élimination du bruit de fond et des chimères) de Croué et co-auteurs (Croué et al., 2013). En utilisant les données brutes de pyroséquençage avant traitement seulement 7 séquences parmi les 5973 totales (0.12%) ont été similaires (plus de 97% d'homologie sur plus de 98% de la région comparable) à celles de nos isolats de Gammaproteobactéries apparentées à *Endozoicomonas elysicola*, indiquant que la plupart des isolats obtenus représentent des bactéries minoritaires associées à *C. crambe*.

Tableau 3 : Identification des différentes bactéries isolées des tissus de *C. crambe* – Procédure d'acclimatation

Classe	Genre	Espèce	Pourcentage d'identité (ADNr 16S)	Nombre de souches	Nombre de phylotypes
Alpha proteobacteria	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>	99	22	3
		<i>japonica</i>	99	2	1
	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>	96	9	1
	<i>Stappia</i>	<i>alba</i>	100	4	1
Gamma proteobacteria	<i>Endozoicomonas</i>	<i>elysicola</i>	93	9	2
	<i>Microbulbifer</i>	<i>cystodytense</i>	99	10	2
		<i>epialgicus</i>	99	2	2
Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>wratislaviensis</i>	98 // 96	4	2
Bacilli	<i>Bacillus</i>	<i>drentensis</i>	99	2	1

Parmi les Alphaproteobactéries, trois genres distincts ont été isolés. Le genre *Pseudovibrio* avec 24 isolats dont deux espèces (les chiffres en parenthèse indiquent le nombre de souches de cette espèce) : *Pseudovibrio ascidiaceicola* (22) et *Pseudovibrio japonica* (2), le genre *Stappia* représenté par l'espèce *Stappia alba* (4) et le genre *Ruegeria* représenté par une espèce apparentée (96% identité) à *Ruegeria atlantica* (9) ce qui laisse supposer que ces isolats appartiendraient à une nouvelle espèce.

Parmi les Gammaproteobacteries, le genre *Microbulbifer* est représenté par les espèces *Microbulbifer cystodytense* (10) et *Microbulbifer epialgicus* (2) et par 9 souches faiblement apparentées (93% d'identité) au genre *Endozoicomonas*. Le faible

pourcentage d'identité de séquence ARNr 16S des souches apparentées au genre *Endozoicomonas* laisse supposer que les isolats correspondants appartiendraient à minima à un nouveau genre bactérien. Il faut noter que pour chaque espèce du genre *Microbulbifer*, 2 phylotypes (séquences différentes d'au moins 1 paire de bases) différents ont été retrouvés pour chaque espèce. Les genres *Pseudovibrio* (4 phylotypes) et *Microbulbifer* (4 phylotypes) sont les plus diversifiés des isolats en terme de micro diversité de l'ADNr16S. Parmi les membres de la classe Actinobacteria du phylum Actinobacteria, un seul genre a été isolé, le genre *Rhodococcus* représenté par deux phylotypes, l'un appartenant à l'espèce *Rhodococcus wratislaviensis* (2) et le second phylotype ayant 96% d'homologie avec cette même espèce pouvant représenter une nouvelle espèce. Enfin, parmi les membres de la classe Bacilli un seul genre a été isolé, le genre *Bacillus* représenté par l'espèce *Bacillus drentensis* (2).

Influence du procédé d'acclimatation sur la diversité des bactéries associées

(i) Evolution des genres bactériens isolés aux différents temps de la procédure d'acclimatation

L'abondance des genres les plus fréquemment obtenus (i.e *Pseudovibrio* ; *Microbulbifer* ; *Stappia* ; *Rhodococcus*. ; *Ruegeria*. et *Endozoicomonas*) a été exprimée en unité formant colonie par mL (UFC/mL) en fonction des différents temps d'acclimatation (Figure 16). Les abondances des souches appartenant aux genres *Pseudovibrio* spp. et *Stappia* sp. ont présenté une évolution similaire au cours du temps, avec un effet négatif de l'acclimatation. L'abondance des souches isolées sans acclimatation préalable de l'extrait (T₀; 1233 UFC/mL pour *Pseudovibrio* et 333 UFC/mL pour *Stappia*) diminue progressivement jusqu'à disparition presque complète à partir de 48 h d'incubation

(T₂). Les souches appartenant aux genres *Microbulbifer*, *Ruegeria*, *Rhodococcus* et *Endozoicomonas* montrent une évolution différente, augmentant après 24 h d'acclimatation puis diminuant au cours du temps. Bien qu'ils aient été isolées à T₀, *Rhodococcus sp.* et *Endozoicomonas sp.* (respectivement 200 UFC/mL et 333 UFC/mL) ont un nombre d'UFC/mL qui a augmenté à T₁ (respectivement 333 UFC/mL et 5666 UFC/mL) puis a diminué progressivement jusqu'à disparition complète après 48h d'incubation (T₂) pour les isolats *Endozoicomonas* et 72h d'incubation (T₃) pour les souches *Rhodococcus*. *Endozoicomonas* montre cependant la réponse la plus marquante à l'utilisation d'une procédure d'acclimatation.

Les genres *Microbulbifer* et *Ruegeria*, absents à T₀, sont apparus quant à eux en faible concentration à T₁ (133 UFC /mL pour *Microbulbifer* et 166 UFC/mL pour *Ruegeria*), avant que leur abondance ne diminue à T₂ puis à T₃.

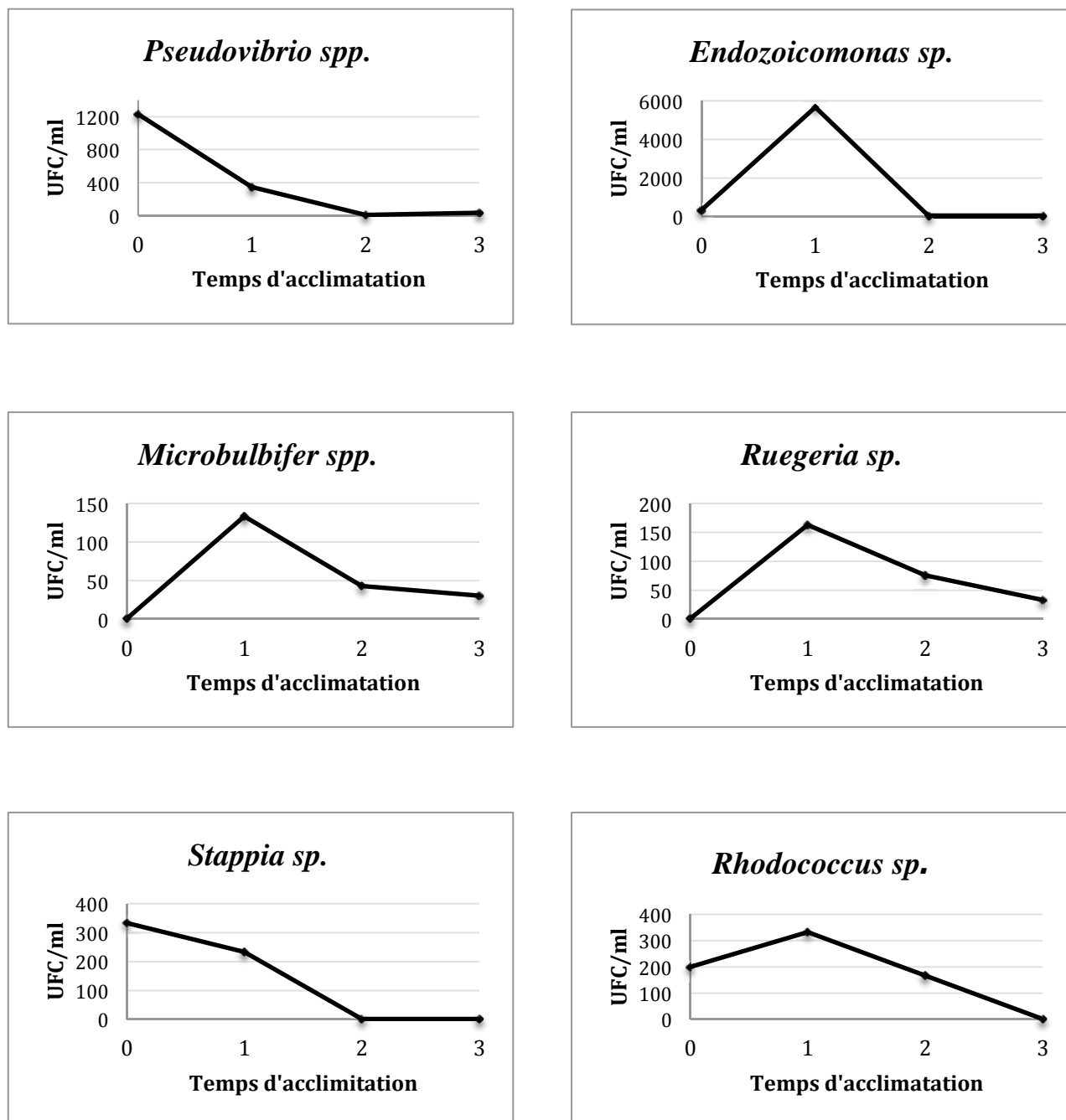


Figure 16. Evolution de l'abondance des 6 genres représentés au cours des différents temps du procédé d'acclimatation. Pour les genres représentés par une seule espèce, le suffixe sp. (species) a été utilisé. Quant aux genres représentés par plusieurs espèces, le suffixe spp. (species pluralis) a été utilisé.

(ii) Evolution de la richesse des phylotypes bactériens isolés au cours des différents temps de la procédure d'acclimatation

Le nombre maximal de phylotypes et de genres isolés à partir de l'extrait de *C. crambe* varie au cours de la procédure d'acclimatation. Le maximum de phylotypes est obtenu au temps T₁ avec 8 différents phylotypes observés. Il en est de même avec le nombre de genres différents isolés avec un maximum de 6 pour le temps T₁. Un effet intéressant de la dilution sur la diversité a été observé aux points de prélèvement T₀ et T₃. En effet, on constate une augmentation du nombre de phylotypes après dilution de l'inoculum au dixième. (Figure 17).

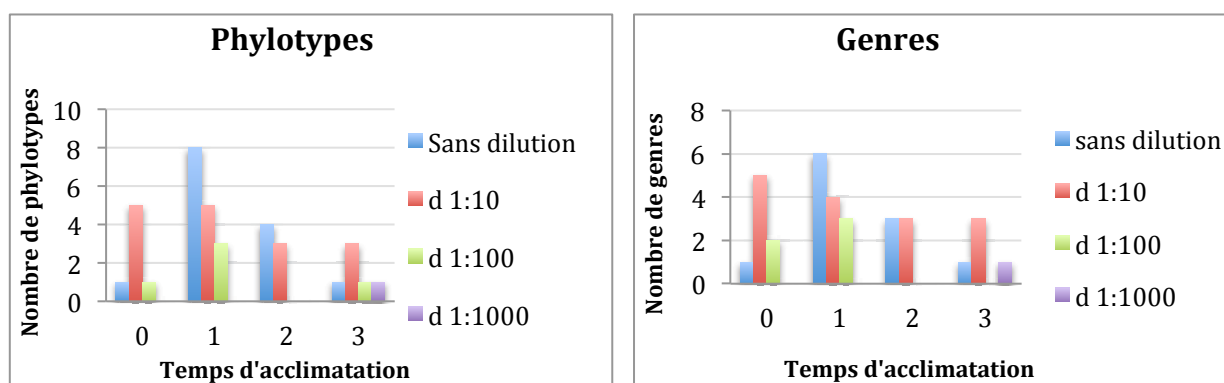


Figure 17. Représentation des différents phylotypes et genres isolés au cours des étapes d'acclimatation en fonction des dilutions.

b- Culture sur milieux spécifiques

L'utilisation de 8 milieux de culture spécifiques a permis l'isolement de 12 phylotypes distincts : 9 nouveaux phylotypes associés à *C. crambe* et 3 phylotypes identiques à ceux isolés lors de la procédure d'acclimatation (Tableau 4). De nouveau, la

bêtaprotéobactérie, symbionte majoritaire de *C. crambe* décrite par Croué et collaborateurs (Croué et al., 2013) n'a pas été isolée.

Tableau 4 : Identification des différentes bactéries isolées des tissus de *C. crambe* – Milieux spécifiques.

Milieu	Classe	Genre	Espèce	Pourcentage d'identité (ADNr16S)
AOB	Gamma proteobacteria	<i>Microbulbifer</i>	<i>epialgicus</i>	99%
	Alpha proteobacteria	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>	99% 2 phylotypes
		<i>Labrenzia</i>	<i>aggregata</i>	98%
	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>wratislaviensis</i>	99%
		<i>Nocardia</i>	<i>araensis</i>	98%
AOB sans sel	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>tukisamuensis</i>	98%
		<i>Micromonospora</i>	<i>pisi</i>	96%
MR2A ^{1/5} sans sel	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	<i>gadium</i>	98%
		<i>Kocuria</i>	<i>rhizophila</i>	99%
	Gamma Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	<i>towneri</i>	98%
	Bacilli	<i>Bacillus</i>	<i>pumilis</i>	99%

Trois milieux de culture sur les huit testés ont permis l'isolement de ces 12 phylotypes : les milieux dits « AOB », « AOB salinité réduite », et MR₂A 1/5 « salinité réduite ». Certaines souches isolées sur les milieux dits « AOB » sont très proches de celles obtenues lors de la procédure d'acclimatation et isolées sur le milieu MR₂A 1/5 et ne

représentent pas des genres apparentés aux bactéries ammonio-oxydantes. Nous suspectons de ce fait, que l'agarose ou l'inoculum contient suffisamment de carbone organique pour avoir permis leur croissance.

c- Culture en dilution

Après analyse par cytométrie en flux de l'ensemble des microplaques (avec et sans « jus d'éponge » ajouté) après deux mois et deux ans d'incubation à 20°C à l'obscurité, aucune croissance bactérienne n'a pu être détectée.

Discussion

Au cours de cette étude, différentes techniques de culture ont été mises en place pour isoler les bactéries des tissus de l'éponge méditerranéenne *C. crambe* et plus particulièrement la bêtaprotéobactérie majoritaire associée à cette éponge (Croué et al., 2013). L'utilisation d'une procédure d'acclimatation (inspirée de Hahn et al., 2003) a permis d'augmenter la culturabilité des micro-organismes associés à *C. crambe*. Cependant, cela n'a pas permis l'isolement de cette bêtaprotéobactérie. L'utilisation de 8 milieux de culture ciblant des bactéries « AOB », et mimant des conditions proches de celles retrouvées au sein du mésohyle de l'éponge, ainsi qu'un essai de culture en dilution avec l'ajout de jus de *C. crambe* n'ont pas non plus permis l'isolement de ce micro-organisme. Ces tentatives visant à mimer l'habitat naturel de ces bactéries associées aux éponges marines ne sont donc pas adaptées. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une récente étude menée par Oztürk et collaborateurs (Oztürk et al., 2013). Ils isolèrent 107 souches bactériennes par l'utilisation de 16 milieux de cultures solides de composition distincte, mais aucune ne correspondît à la bêtaprotéobactérie majoritaire de *C. crambe* (Oztürk et al., 2013). Ces résultats ne sont pas surprenants compte tenu du fait que la plupart des symbiontes majoritaires des éponges sont difficilement isolables, plusieurs études rapportent que seulement 0,1 à 14% de la totalité des micro-organismes associés aux éponges seraient cultivables (Friedrich et al., 2001 ; Olson et al., 2005 ; Sipkema et al., 2011 ; Schippers et al., 2012).

Au cours de la technique d'acclimatation, 64 isolats ont été obtenus dont 2 nouvelles espèces, probables appartenant aux genres *Ruegeria* et *Rhodococcus*, ainsi qu'un potentiel nouveau genre apparenté à *Endozoicomonas*. Ils appartiennent à 3 phyla: *Proteobacteria* (90,625%), *Actinobacteria* (6,25%) et *Bacilli* (3,125%). Les

Protéobactéries sont les micro-organismes les plus abondamment mis en évidence lors des études de distribution phylogénétique des micro-organismes associées aux éponges (Webster et Taylor, 2012) ainsi que le phyla le plus représenté chez les éponges dites LMA (Giles et al., 2013). Les genres *Pseudovibrio* sp., *Microbulbifer* spp., et *Ruegeria* spp. ont également été isolés à partir des tissus de *C. crambe* par Oztürk et collaborateurs et représentent dans ces deux études, les genres les plus fréquemment isolés. Ces genres sont également isolés à partir de nombreuses autres éponges et invertébrés marins (Webster et al., 2001b ; Enticknap et al., 2006), et semblent ainsi faire partie de la fraction « rare » mais constante des micro-organismes associés aux invertébrés marins.

Malgré le fait que la procédure d'acclimatation n'ait pas permis l'isolement de la bactérie dominante associée au mésohyle de *C. crambe*, elle a néanmoins permis une augmentation du nombre de genres ainsi que de phylotypes isolés. En effet, en étudiant l'évolution des six genres bactériens isolés au cours de cette étude, seuls quatre d'entre eux ont été isolés sans acclimatation préalable (*Pseudovibrio*, *Stappia*, *Rhodococcus*, and *Endozoicomonas*). Ainsi l'acclimatation a permis l'isolement de souches provenant de deux genres bactériens supplémentaires *Microbulbifer* et *Ruegeria*. La culturabilité des souches apparentées au genre *Endozoicomonas* est, de plus, très nettement augmentée au temps T₁ de l'expérimentation (333UFC/mL à T₀ et 5666UFC/mL à T₁). En observant l'évolution du nombre de phylotypes isolés au cours de cette étude, on constate aussi leur augmentation après un jour d'acclimatation. Ceci laisse suggérer l'utilité d'acclimater l'extrait dans le but d'augmenter la diversité bactérienne cultivable présente au sein d'un échantillon et par conséquent la chimiodiversité disponible.

Après analyse comparative des séquences obtenues lors du pyroséquencage (Croué et al., 2013) et des séquences des souches cultivées, il a été mis en évidence que seules les souches apparentées au genre *Endozoicomonas* étaient également présentes dans les données de pyroséquencage (0.11% des séquences affiliées aux 2 phylotypes de ce genre). Ce genre a présenté aussi une réponse positive à la procédure d'acclimatation à T₁, et est fréquemment retrouvé en association avec divers invertébrés marins comme les coraux (Kurahashi et Yokota, 2007), mais pas dans le plancton marin d'après les données de Yooseph et collaborateurs (Yooseph et al., 2012). Ceci laisse donc penser que même si l'utilisation de la procédure d'acclimatation n'a pas permis la culture de la bactérie majoritaire elle a contribué à d'augmenter la culturabilité d'une bactérie qui présente probablement une étroite relation avec son hôte. Cette faible correspondance entre les résultats obtenus lors des techniques indépendantes et dépendantes de la culture a également été observée lors de plusieurs études portant sur l'investigation des micro-organismes associés aux éponges (Isaacs et al., 2009 ; Sun et al., 2010 ; Oztürk et al., 2013 ; Montalvo et al., 2014).

Aux temps T₂ et T₃ de la procédure d'acclimatation, il est observé une diminution du nombre de genres ainsi que de phylotypes isolés. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées, (i) un effet de l'augmentation de la température ou (ii) un effet de l'augmentation de la concentration de substrats. Il a été rapporté qu'une concentration trop importante en nutriment induirait un stress pour les micro-organismes et ainsi conduirait à une diminution de leur culturabilité (Muscholl-Silberhorn et al., 2008). Cependant le fait que la totalité des souches ait été cultivée sur un milieu très riche (Marine Broth) à 25°C ne soutient pas cette dernière hypothèse. Des hypothèses

alternatives peuvent être proposées (iii) le développement au sein de l'extrait acclimaté d'un micro-organisme producteur d'un inhibiteur de croissance des autres souches, ou (iv) un effet du temps de sensibilisation des micro-organismes aux métabolites secondaires présents dans les extraits d'éponge, alcaloïdes guanidiniques ayant une importante activité antimicrobienne (Becerro et al., 1994).

En support de l'hypothèse (iii), lors de l'étude de l'évolution du nombre de phylotypes et genres au cours des différents temps du procédé d'acclimatation, un effet de la dilution pour les temps T_0 et T_3 a été constaté. Pour chacun de ces cas un phylotype unique a été isolé sans dilution préalable de l'extrait, le phylotype *Pseudovibrio ascidiecola* à T_0 et le phylotype *Microbulbifer cystodytense* à T_3 . Après dilution au dixième de ces mêmes extraits, le développement de souches appartenant à d'autres phylotypes et genres bactériens a été observé. Précédemment il a pu être mis en évidence la forte activité antimicrobienne des souches appartenant aux genres *Pseudovibrio* et *Microbulbifer* (Kennedy et al., 2009 ; O'Halloran et al., 2011 ; Penesyan et al., 2011), ce qui suggère la possibilité d'interactions allélopatiques entre les espèces retrouvées. Nous pourrions être ici en présence d'interactions entre micro-organismes au sein des boîtes de culture. Les souches appartenant à ces deux genres pourraient inhiber le développement d'autres souches bactériennes lorsqu'elles sont présentes en abondance dans les boîtes de culture, et donc l'utilisation de multiples dilutions pourrait être une façon d'augmenter la diversité des bactéries cultivables. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un test antimicrobien croisé sur milieux de culture solides entre toutes les souches isolées.

Conclusion

L'utilisation d'une procédure d'acclimatation (inspirée de Hahn et al., 2003) ainsi que de divers milieux de culture mimant des conditions proches de celles qui sont retrouvées au sein du mésophyle de l'éponge, ou présupposant un métabolisme de la bactérie majoritaire associée à *C. crambe* (oxydation d'ammonium), n'ont pas permis l'isolement de la bêtaprotéobactérie spécifique associée à cette éponge. Ces résultats viennent compléter ceux obtenus par Oztürk et collaborateurs (2013), portant sur l'étude de la diversité bactérienne cultivable de *C. crambe* et confirment le fait que la bêtaprotéobactérie majoritaire est difficilement cultivable en dehors de son hôte. Cependant, la multiplication des milieux de culture a contribué à augmenter la culturabilité de certains micro-organismes minoritaires associés à *C. crambe* permettant l'accès à une diversité microbienne toujours plus importante et par la même à une plus grande chimiodiversité disponible (Hill, 2004).

Chapitre 4

Crambe crambe: Métabolites bioactifs et micro-organismes associés

Mots clés : Culture *ex situ* / stress abiotique/ analyses chimiques / caractérisation structurale / alcaloïdes guanidiniques / MALDI-TOF/ TOF-SIMS

Introduction générale

Les premiers résultats de ces travaux de thèse ont démontré que la communauté microbienne associée à l'éponge *Crambe crambe* est faiblement diversifiée et dominée par une unique OTU regroupant à elle seule près de 74% de l'ensemble des séquences obtenues par pyroséquencage-454 de l'ARNr16S total. Cette OTU est affiliée à une bêtaprotéobactérie (Chapitre 2). L'utilisation de différentes techniques de culture des micro-organismes associés à cette éponge méditerranéenne a permis l'isolement de micro-organismes minoritairement présents au sein des tissus de *C. crambe* cependant elles n'ont pas permis l'isolement du micro-organisme majoritaire (Chapitre 3).

L'importante concentration des alcaloïdes guanidiniques présents dans les extraits de *C. crambe* (environ 0,1 à 1% du poids sec) n'est pas en faveur d'une biosynthèse par des micro-organismes minoritairement associés à celle-ci. Cependant, afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse nous avons comparé la composition chimique des cultures bactériennes des souches isolées (Chapitre 3) et des tissus de *C. crambe* (**Chapitre 4 - Partie 1**).

Du fait de la forte concentration des métabolites secondaires au sein des tissus de l'éponge, le principal micro-organisme pouvant intervenir à part entière dans leur synthèse est le micro-organisme majoritairement présent à savoir la bêtaprotéobactérie non cultivable à ce jour. Afin d'apporter des éléments pour évaluer son possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques, nous avons cherché à modifier la composition de la communauté microbienne associée à *C. crambe* et plus particulièrement à affecter l'OTU majoritaire par culture *ex situ* de colonies d'éponge en présence d'un stress abiotique par diminution du pH de l'eau environnante. L'impact

d'un tel stress sur les colonies sera suivi par analyse chimique des extraits de *C. crambe*. Comme il sera difficile d'imputer les éventuelles modifications d'empreintes chimiques aux modifications de communauté microbienne (en effet, puisqu'il s'agit ici d'une symbiose, nous ne pouvons pas nous affranchir du stress de l'hôte), cette étude prévoyait initialement de réaliser, en parallèle, une étude de la communauté bactérienne des éponges stressées. Les différents cas de figures envisagés et leur interprétation sont présentés ci dessous (Figure 18) **(Chapitre 4 – Partie 2)**.

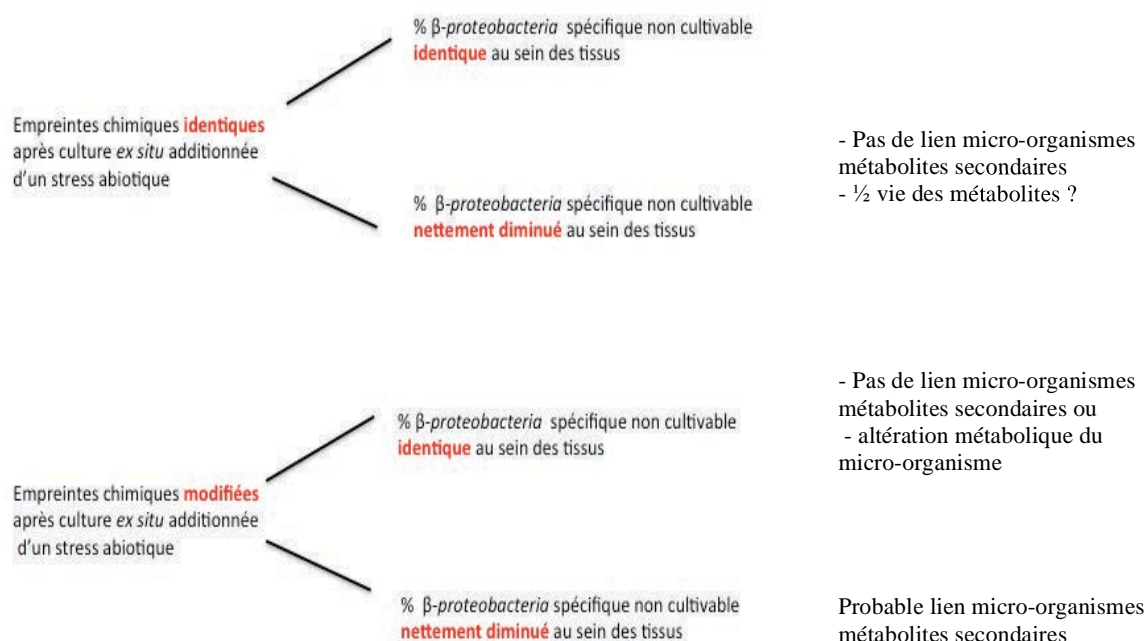


Figure 18. Possibles cas de figures et interprétations de l'expérience de stress pH.

L'interprétation des résultats de l'étude préliminaire de stress (partie 2) et les conditions analytiques des extraits bruts de *C. crambe* optimisées au cours de ce Chapitre 4 ont permis de mettre en évidence la présence de composés non caractérisés

dans cette éponge. Ceci nous a amené à compléter sa carte d'identité chimique et a purifier un nouvel alcaloïde, mis en lumière lors de l'expérience de stress et dont la structure apporte des éléments de réflexion sur la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques de *C. crambe* **(Chapitre 4 - partie 3)**.

Pour finir, nous nous sommes intéressés à la localisation *in situ* des alcaloïdes caractérisés dans cette éponge en imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF (« Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight ») et TOF-SIMS (« Time Of Flight – Secondary Ion Mass Spectrometry »). Les expériences de spectrométrie ont été réalisées à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette. La distribution spatiale des métabolites secondaires peut, en effet, apporter des informations sur leur rôle au sein de ces invertébrés mais également des pistes quand à l'organisme producteur (dans le cas des associations) ou le type cellulaire dans lequel ils sont potentiellement stockés. L'étude de faisabilité et les premiers résultats sont rédigés sous format d'une publication dans la dernière partie de ce chapitre **(Chapitre 4 - partie 4)**.

Partie 1. Comparaison des empreintes chimiques des bactéries obtenues lors de la procédure d'acclimatation et des tissus de *Crambe crambe*

Introduction

La culture de micro-organismes associés aux éponges a permis d'attribuer la synthèse de certains métabolites secondaires extraits de ces invertébrés à leurs micro-organismes associés (Introduction – Chapitre 3). L'étude de la diversité bactérienne cultivable associée à *C. crambe* par la procédure d'acclimatation ou encore les milieux sélectifs a conduit à l'isolement de nombreuses souches bactériennes appartenant pour certaines à un nouveau genre probable et une possible nouvelle espèce. Bien que ces micro-organismes isolés soient minoritaires au sein de la communauté microbienne associée à *C. crambe*, et que l'importante concentration en alcaloïdes guanidiniques des extraits ne soit pas en faveur d'une biosynthèse par des micro-organismes minoritaires, leur possible implication ne peut pas être complètement exclue. C'est pourquoi nous avons comparé les empreintes chimiques des souches isolées à celle des tissus de *C. crambe*.

Le protocole d'extraction et d'analyse des métabolites bioactifs de *C. crambe* a été optimisé à partir du protocole standardisé « ECIMAR ». ECIMAR (« Ecologie Chimique MARine, indicateurs de biodiversité et valorisation ») est un programme mis en place en 2006 afin d'évaluer la bio- et chimiodiversité méditerranéenne à travers divers axes de recherches centrés autour de l'écologie chimique marine. Ce projet a été soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR Biodiversité) et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN). Il a regroupé des biologistes et des chimistes marins, dont

ceux de l'USR 3278 de l'Université de Perpignan. Dès la création du programme ECIMAR, un protocole standardisé d'extraction et d'analyse a été mis au point afin d'enregistrer les signatures chimiques de tous les organismes prélevés au sein de la communauté modèle étudiée permettant d'obtenir des résultats (chromatogrammes) homogènes, reproductibles et comparables entre les différentes équipes partenaires. Au cours de cet inventaire de la chimiodiversité méditerranéenne, des espèces dites « modèles » ont été sélectionnées et récoltées dans les sites explorés. *C. crambe* est une des espèces choisies dans le phylum des spongiaires. Les signatures chimiques acquises (chromatogrammes enregistrés à partir des extraits récoltés au Liban, en Corse, en Grèce et à Marseille) sont téléchargeables à partir de la base de données du portail ECIMAR (<http://www.ecimar.org/>). La signature chimique correspond à une « image », à un temps et dans des conditions donnés, de la composition chimique de l'organisme. Un exemple de signature est donné ci-après (Figure 19). Les alcaloïdes guanidiniques présents dans l'extrait d'éponge sont principalement élués entre 25 et 30 minutes, absorbent en UV à 254 et 280 nm et sont très nettement visibles avec le détecteur à diffusion de lumière (ELSD). Ces travaux antérieurs ont servi de base à la mise au point de protocoles d'extraction et d'analyses optimisés utilisés dans ce chapitre.

http://www.ecimar.org/cmsv2/images/stories/protocole_wp1_141207.pdf

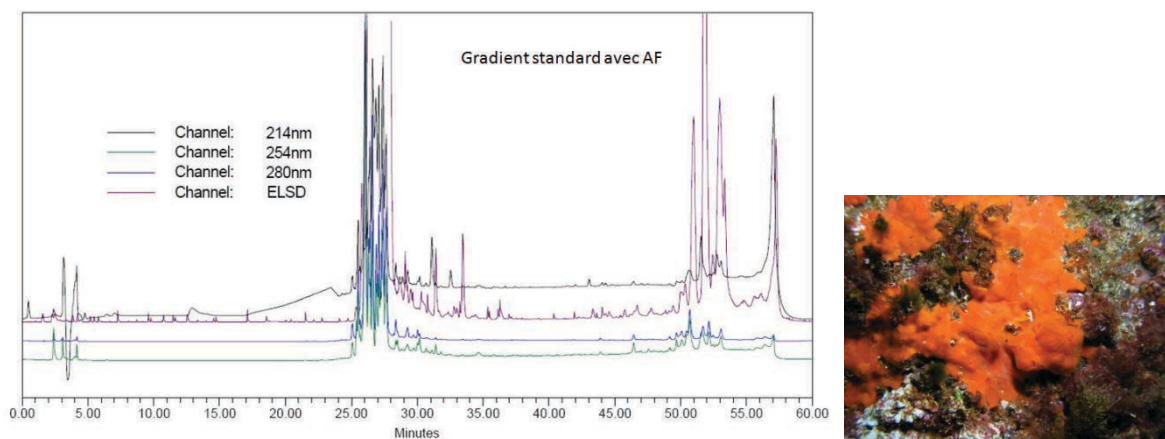


Figure 19. Signature chimique ID 190 - 070717Ma4-34 (O. Thomas) et photo ID 176 - 070717Ma4-34 (T. Perez) de *C. crambe* récolté à Marseille (source base de données site ECIMAR <http://www.ecimar.org/cmsv2/index.php/fr/top-base-de-donnees-publisher>).

Matériel et Méthodes

1. Généralités

A. Outils analytiques

Les instruments utilisés ont été mis à disposition par la Plate-forme Bio2Mar (bio2mar.obs-banyuls.fr). Les profils en chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été réalisés sur une chaîne CLHP Waters Alliance 2695 équipée d'un injecteur automatique d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes Waters 2998 et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière ELS 2424. Le système est équipé d'une plateforme de pilotage, d'acquisition et de traitement Empower.

Les analyses en LC/MS ont été effectuées sur une chaîne CLHP Thermo Scientific LCQ Fleet 23000 comprenant une pompe CLHP à gradient quaternaire Accela 600, un passeur automatique d'échantillons Accela, un détecteur UV-visible à barrette de photodiodes Accela, un détecteur de masse de type trappe d'ions avec une source

d'ionisation par électrospray (ESI). Le système est équipé d'une plateforme de pilotage, d'acquisition et de traitement Xcalibur.

Les solvants utilisés en chromatographie sont de grade CLHP.

B. Protocole de préparation et d'analyse des échantillons pour l'acquisition de leur empreinte chimique

a) Collecte des échantillons de *C. crambe* sur substrat inerte

L'ensemble des échantillons a été collecté en plongée sous-marine dans la baie de Banyuls-sur-Mer (Méditerranée). Ils ont été prélevés dans des sacs en plastique numérotés et le point GPS du site de plongée a été relevé. Dès la sortie de l'eau, les sacs contenant les échantillons ont été vidés de leur eau, et les tissus rapidement nettoyés (élimination des débris de substrats suivi d'un rinçage des tissus à l'aide d'eau de mer filtrée stérile) avant d'être conservés à -80°C jusqu'à lyophilisation (Lyophilisateur HETO modèle FD3 -50°C).

b) Préparation des extraits de *C. crambe*

Le protocole optimisé au cours de cette étude à partir du protocole standardisé « ECIMAR » (cf. Tableau 5) est le suivant :

Le matériel biologique collecté lyophilisé est réduit en poudre, pesé et conservé au congélateur à -20°C jusqu'à extraction. Pour chaque analyse, 20 mg environ (pesée exacte) de matériel biologique sont extraites avec CH₂Cl₂/MeOH (1/1 v/v ; 2x 2mL, ultrasons 2x 10min). Après filtration sur coton, évaporation à sec sous azote et reprise dans 500 µL de MeOH, chaque extrait est filtré sur filtre seringue PTFE 0,22 mm ; 1,3 mm Clarinet™ et transvasé dans un vial de 1,5 mL Jasco™ avec bouchon à septum pour

analyse chromatographique. Lorsque le volume de l'échantillon est inférieur à 1 mL, les vials sont équipés d'inserts de 0,35 mL Supelco™.

c) Acquisition des empreintes chimiques de *C. crambe*

Les conditions chromatographiques utilisées au cours de ces études ont été optimisées à partir du protocole standardisé « ECIMAR ».

Conditions 1

- Colonne Gemini C6-phenyl (150 x 3 mm, 5 µm) Phenomenex™
- Solvants: H₂O + 1 ‰ d'acide formique et CH₃CN + 1 ‰ d'acide formique,
- Injection : 10 µL,
- Débit : 0,5 mL/min,
- Température de la colonne : 25°C

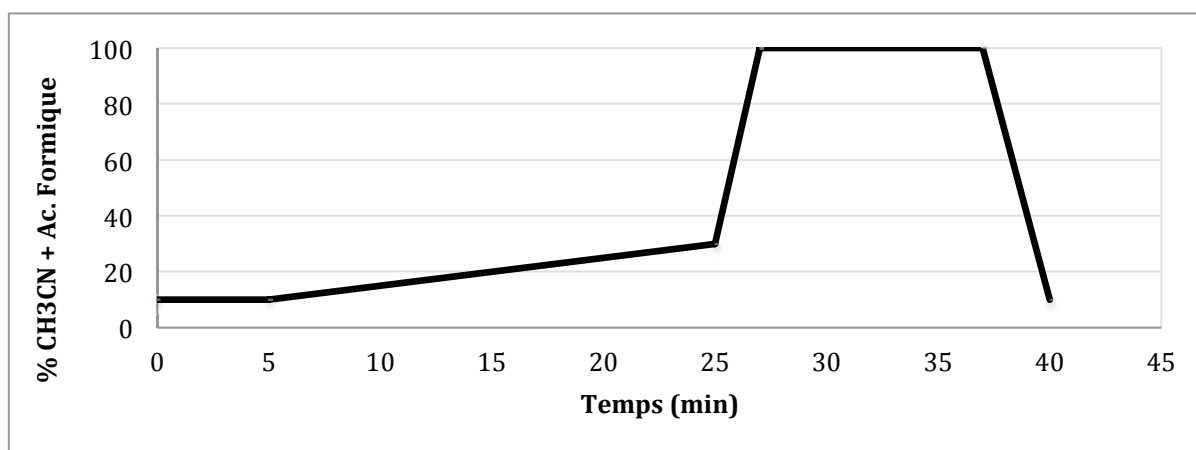


Figure 20. Gradient d'élution optimisé des analyses en conditions 1.

Conditions 2

- Colonne Gemini C18 (150 x 3 mm, 5 µm) Phenomenex™
- Solvants: H₂O + 1 ‰ d'acide formique et CH₃CN + 1 ‰ d'acide formique,
- Injection : 10 µL,
- Débit : 0,5 mL/min,
- Température de la colonne 25°C

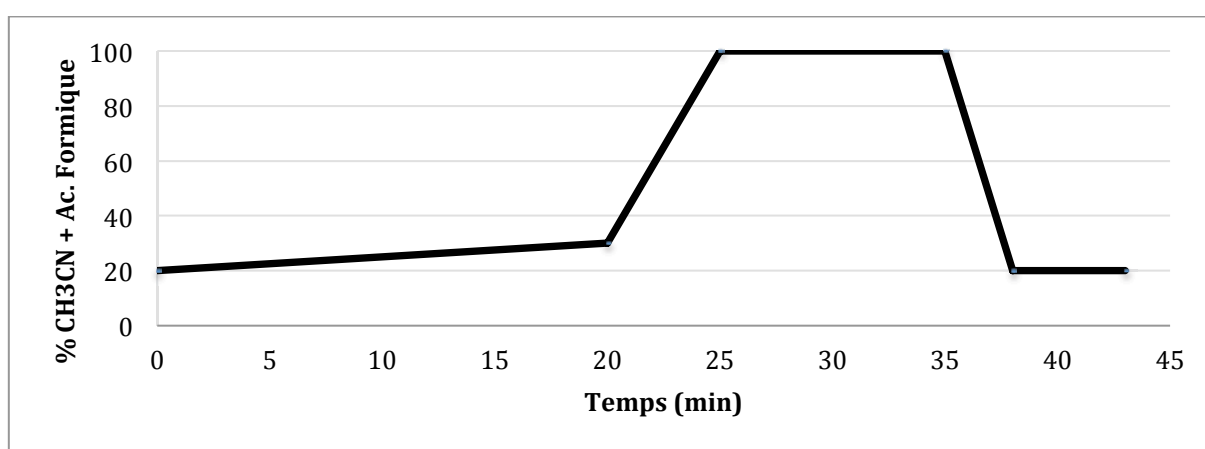


Figure 21. Gradient d'élution optimisé des analyses en conditions 2.

En CLHP/DAD/ELSD, la longueur d'onde d'extraction des chromatogrammes a été fixée à 290 nm (λ max d'absorption des alcaloïdes guanidiniques) pour la détection UV.

Les conditions de détection par ELSD sont les suivantes :

- température du drift tube : 65°C
- température du nébuliseur : 48°C
- pression du gaz (air comprimé) : 50 psi
- gain : 40 de 0 à 5 minutes et 600 de 5 à 35 minutes

Le gain du détecteur à diffusion de lumière est diminué pendant les 4 premières minutes d'élution lors des analyses en CLHP/UV/ELSD.

En LC/MS, les conditions fixées pour le détecteur sont les suivantes :

- mode d'ionisation ESI+ avec gamme de masses de m/z allant de 100 à 1500 Da.
- tension de la source ESI : 4 kV
- tension du capillaire de transfert : 38,37 V
- tension tube lens : 119 V
- débit de gaz ionisant/ de balayage/ auxiliaire : 20/1/5
- température de vaporisation 273° C

Les analytes élués de la colonne avant 4 minutes ne sont pas envoyés vers le détecteur.

2. Comparaison de la composition chimique des cultures bactériennes obtenues lors de la procédure d'acclimatation et des tissus de *C. crambe*

Les souches bactériennes isolées et mises en culture lors de la procédure d'acclimatation (Chapitre 3) ont été extraites en adaptant le protocole d'extraction utilisé pour l'éponge au surnageant obtenu après centrifugation du culot bactérien.

Une souche bactérienne représentative de chaque phylotype bactérien isolé au cours de la procédure d'acclimatation (Chapitre 2 – Multiple approches de culture dans le but d'isoler la bêta-protéobactérie majoritaire associée à l'éponge Méditerranéenne *Crambe crambe*) a été mise en culture liquide dans 8 mL de milieu Marine Broth (Marine Broth 2216 Difco) et placés à l'obscurité en condition statique pendant 7 jours à 25°C. La croissance bactérienne a été arrêtée par centrifugation de la culture liquide pendant 10

min à 9000 RCF. Le culot et surnageant de chaque souche ont été extraits séparément. Les culots, après lyophilisation, en suivant le **protocole standardisé ECIMAR (cf. Tableau 5)**. Les surnageants (300 mL) ont été pré-filtrés sur porosité 1,2 µm (Acrodisc®32) avant extraction sur phase solide. Les extraits ont été analysés en CLHP/DAD puis en LC/MS (**Conditions 1**) mises au point précédemment.

Résultats

a- Optimisation du protocole d'extraction

Etant donné le grand nombre d'analyses prévues au cours de ces travaux, il a été nécessaire d'optimiser les protocoles d'extraction afin que la méthode soit la plus économique possible tant d'un point de vue environnemental que financier. La quantité à prélever devait en effet être la plus faible possible afin de limiter l'impact sur les sites de récoltes tout en permettant une analyse correcte. Ainsi nous avons déterminé la quantité minimale de matériel biologique nécessaire pour atteindre des conditions optimales de détection des alcaloïdes à 20 mg. De plus, l'étape d'élimination des sels et des composés hydrophiles par extraction sur phase solide (SPE) prévue dans le protocole standardisé a été éliminée après avoir constaté que le rendement d'extraction des alcaloïdes diminuait suite à cette étape.

De plus, les composés d'intérêts présentant une polarité intermédiaire, cette zone du chromatogramme n'était pas affectée par la présence de composés hydrophiles (composés éliminés par l'utilisation d'une cartouche SPE lors de l'étape de lavage à l'eau ultrapure), à condition d'adapter les conditions de détection en chromatographie liquide

(voir Matériel et méthode). Le protocole d'extraction ainsi optimisé est présenté dans le tableau 5.

Tableau 5 : Comparaison du protocole standardisé « ECIMAR » et du protocole optimisé pour l'extraction des métabolites secondaires de *C. crambe*.

	Protocole « ECIMAR »	Protocole OPTIMISE
Masse de matériel biologique lyophilisé	2g	20 mg
Solvant d'extraction	3 x 20 mL de CH ₂ Cl ₂ /MeOH 1/1 (v/v) + ultrasons	2 x 2mL de CH ₂ Cl ₂ /MeOH 1/1 (v/v) + ultrasons
Préparation	Dépôt solide Dessalage sur SPE Analyse CLHP	Filtration Analyse CLHP

b- Optimisation du protocole d'analyse

Dans ce chapitre 4, deux conditions d'analyses ont été utilisées pour enregistrer les empreintes chimiques de *C. crambe* de manière à améliorer le profil alcaloïdique, c'est-à-dire, la séparation des composés de polarité intermédiaire visibles en milieu de gradient sur les chromatogrammes.

La première est une optimisation du gradient d'élution sur la colonne Gemini C6-phenyl (150 x 3 mm, 5 µm) Phenomenex™, de greffage identique à celle du protocole standardisé ECIMAR (Figure 22 - Conditions 1). Pour la seconde, nous avons choisi d'utiliser une colonne Gemini C-18 (150 x 3 mm, 5 µm) Phenomenex™, plus hydrophobe que la précédente. Nous avons pu, après optimisation du gradient d'élution, obtenir une meilleure séparation des alcaloïdes présents dans l'extrait (Figure 23 - Conditions 2).

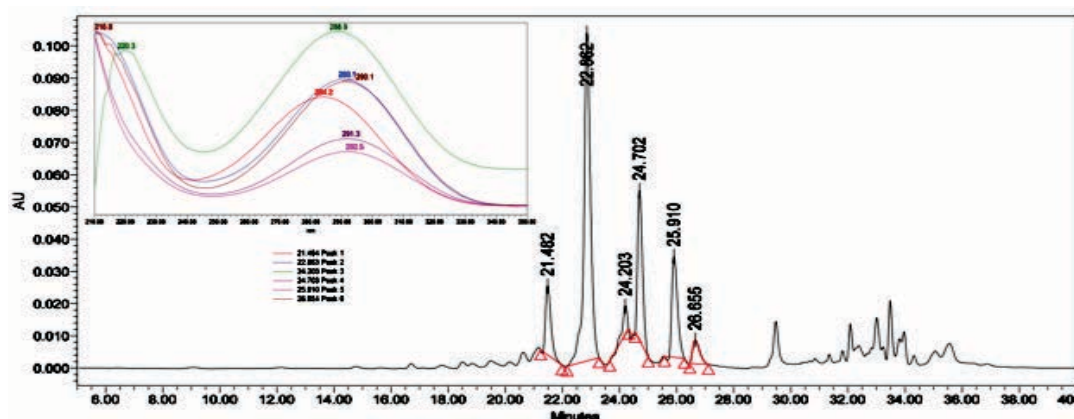


Figure 22. Chromatogramme d'un extrait de *C. crambe* analysé sur colonne Gemini C6-phenyl après optimisation du gradient d'élution (Conditions 1) et détection UV à 290 nm.

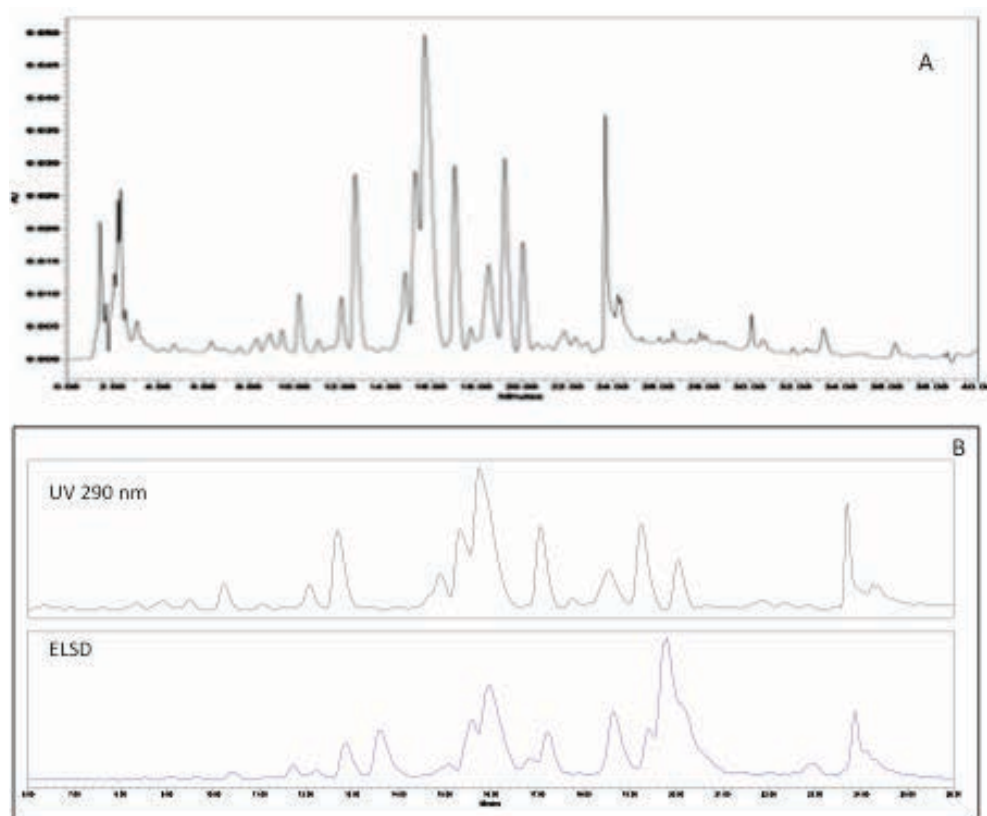


Figure 23. Chromatogrammes d'un extrait de *C. crambe* analysé sur colonne Gemini C18 après optimisation du gradient d'élution (Conditions 2) avec détection UV à 290 nm (A) et agrandissement avec détection UV/ELSD (B).

c- Comparaison des empreintes chimiques de C. crambe et des bactéries obtenues par acclimatation

Sur les chromatogrammes obtenus après injection des extraits de l'ensemble des souches bactériennes en CLHP/DAD, on n'observe, à 290 nm, aucune similitude avec l'empreinte chimique alcaloïdique des extraits bruts de *C. crambe* (Figures 24, 25 et 26). La différence des temps de rétention des composés détectés et/ou de leurs spectres UV suggère que ces extraits de souches bactériennes n'en contiennent pas. Les composés présents sur les chromatogrammes des extraits des souches bactériennes n'ont pas été identifiés, certains sont présents dans le blanc donc proviennent du milieu de culture. Les masses des alcaloïdes ciblés ont également été recherchées par extraction à partir du TIC (Courant Ionique Total) en LC/MS. Aucune n'a pu être trouvée dans les extraits des colonies isolées.

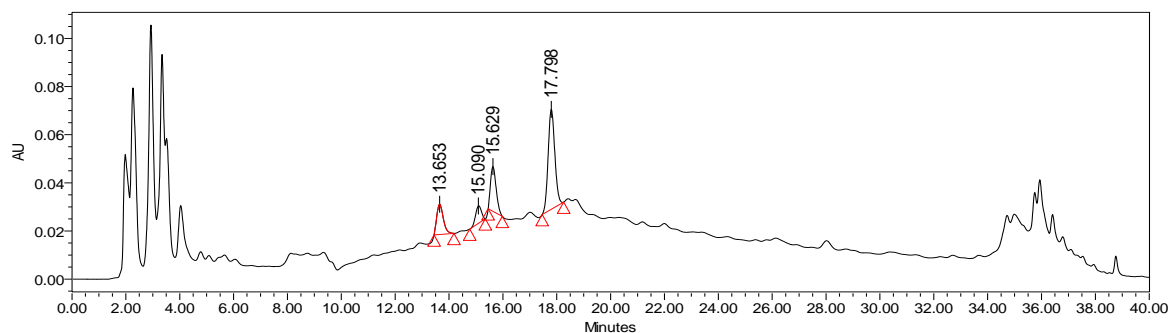


Figure 24. Chromatogramme CLHP/DAD à 290 nm d'un extrait obtenu à partir de la souche R0/10 (phylotype 1) de *Pseudovibrio ascidiaceicola* (Conditions 1).

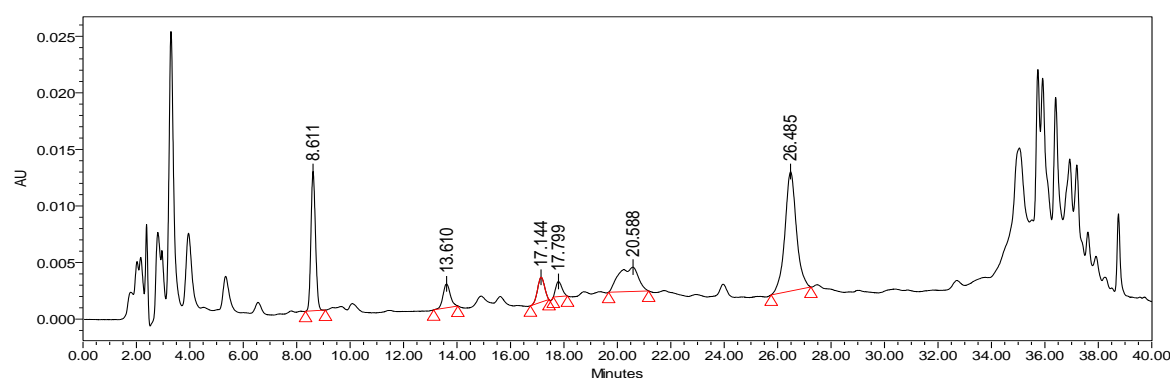


Figure 25. Chromatogramme CLHP/DAD à 290 nm d'un extrait obtenu à partir de la souche R1/8 (phylotype 11) d'*Endozoicimonas elysicola* (Conditions 1).

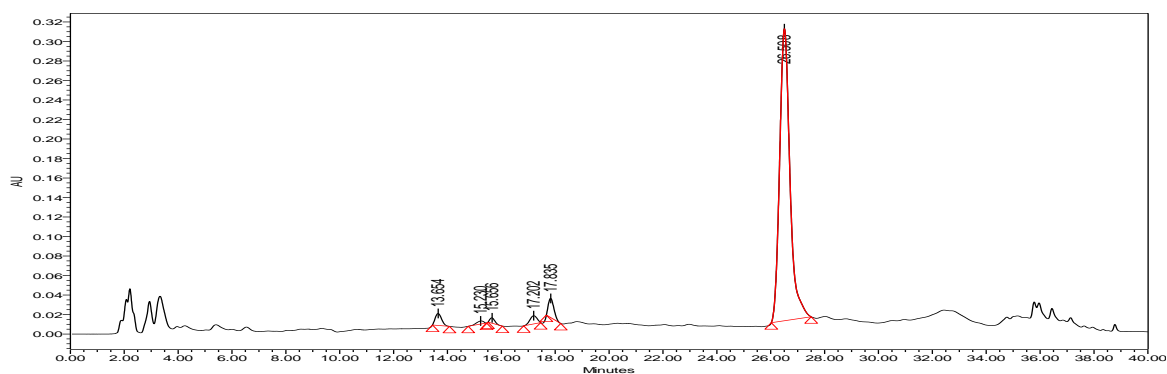


Figure 26. Chromatogramme CLHP/DAD d'un extrait obtenu à partir de la souche R1/2 (phylotype 10) de *Microbulbifer cystodytense* (Conditions 1).

Discussion

Ce résultat est loin d'être surprenant. En effet, comme nous l'avons dit précédemment, l'importante concentration des alcaloïdes guanidiniques présents dans les extraits de *C. crambe* n'était pas en faveur d'une biosynthèse par des micro-organismes minoritairement associés à celle-ci. Par la comparaison des empreintes chimiques des extraits de ces souches et celles de l'éponge, l'hypothèse selon laquelle ces micro-organismes n'étaient pas producteurs à part entière a pu être renforcée (pour ces conditions de milieu de culture et de croissance). Dans ces conditions optimales de culture, si ces micro-organismes avaient produit des alcaloïdes, ceux-ci auraient été détectables étant donnée la biomasse extraite. Cependant afin d'affirmer la non implication des micro-organismes minoritairement associés à *C. crambe* dans la synthèse de ces alcaloïdes, il serait nécessaire de multiplier les milieux et conditions de culture. En effet, les conditions de croissance influencent la diversité des métabolites produits par un micro-organisme maximisant ainsi les connaissances sur la chimiodiversité imputable à celui-ci (Hill, 2004).

A ce stade et dans ces conditions d'analyse, le micro-organisme candidat qui n'a pu être écarté reste la bêtaprotéobactérie non-cultivable et pour le moment impossible à extraire spécifiquement en dehors de son hôte.

Partie 2. Expériences de stress abiotique *in situ* sur l'éponge *Crambe crambe*

Introduction

Les essais de culture des micro-organismes associés à *C. crambe* n'ayant pas permis l'isolement du symbionte majoritaire, il est difficile d'évaluer le rôle potentiel de ce dernier dans la synthèse des métabolites secondaires de cette éponge. Afin d'apporter des hypothèses quant à cette problématique, nous avons cherché à modifier la composition de la communauté microbienne associée à l'éponge et plus particulièrement à provoquer la disparition ou altérer le métabolisme du symbionte majoritaire afin de suivre, en parallèle, les possibles effets sur la synthèse des métabolites ciblés.

Cette expérience s'appuie sur le fait qu'il a été montré que la stabilité des communautés microbiennes associées aux éponges pouvait être affectée par la culture *ex situ* des animaux. C'est le cas pour *Ircinia strobilina*, *Mycale laxissima*, *Clathria prolifera*, ou encore *Rhopaloeides odorabile* (Mohamed et al., 2008 ; Webster et al., 2008 ; Isaacs et al., 2009). Cependant, elle n'entraîne pas de modifications majeures des communautés microbiennes associées à *Aplysina cavernicola* ou encore *Aplysina aerophoba* (Friedrich et al., 2001 ; Thoms et al., 2003 ; Gerçe et al., 2009). La stabilité de la communauté microbienne associée aux éponges semble dépendre à la fois de l'espèce étudiée, mais également de la durée et des conditions de culture *ex situ*. De ce fait, la simple mise en culture *ex situ* de colonies de *C. crambe* ne garantissait pas à elle seule un stress suffisant pour altérer la stabilité de sa communauté microbienne symbionte et plus particulièrement de modifier la dominance de l'OTU majoritaire. Par ailleurs, il est

reconnu que les micro-organismes associés aux éponges sont sensibles à de faibles variations environnementales (Staley et al., 1997), ce qui en fait de très bons indicateurs de stress marins. Il a été également montré qu'une modification de la communauté microbienne symbiotique précède le déclin de la santé de l'animal en réponse à une contamination en métaux lourds (Webster et al., 2001a), ou encore à une élévation de température (Webster et al., 2008). Ainsi, l'application d'un stress environnemental durant la culture *ex situ* d'une espèce pourrait entraîner une modification de la communauté microbienne symbiotique. De ce fait, afin de tenter de modifier la communauté microbienne associée à *C. crambe* nous avons choisi de cultiver l'éponge *ex situ* et de la soumettre, de surcroît, à un stress abiotique. Certaines bactéries semblent être affectées par le pH du milieu environnant et plus particulièrement par une acidification de celui-ci, des analyses de diversité microbienne révélant une diminution de leur abondance dans des milieux plus acides (Choi et al., 2010 ; Goffredi et al., 2011). Ainsi, durant la culture *ex situ* de colonies de *C. crambe* nous avons choisi d'appliquer comme stress abiotique, une diminution du pH de l'eau environnante.

Au cours de ces travaux, nous avons été amenés à analyser diverses colonies de *C. crambe* prélevées dans la baie de Banyuls-sur-Mer, à différentes saisons. Dans les conditions d'analyse « 1 », seules des différences minimales étaient visibles entre les empreintes chimiques. Cependant, les analyses dans les conditions « 2 », avec une meilleure séparation du mélange complexe d'alkaloïdes, ont montré qu'il y avait des différences significatives entre les profils chromatographiques (surfaces relatives des pics en UV), indiquant une variabilité inter-coloniale. Pour mener une étude comparative entre des colonies témoins et des colonies stressées, il était donc

indispensable de s'affranchir de cette variabilité intraspécifique. Mais comment mener une étude comparative sur les tissus d'une unique colonie en évitant la rupture d'une importante zone tissulaire en la divisant en deux ? En effet, nous avons souvent constaté que des lésions dans les tissus provoquaient, en aquarium, la mort de l'éponge. Il faut donc limiter au maximum le stress de l'animal lors de l'échantillonnage. Pour cette expérience, nous avons alors choisi d'utiliser des *Arca noae* colonisées par *C. crambe*. Notre hypothèse est que les deux coques d'un mollusque sont recouvertes par une unique colonie de *C. crambe* qui a colonisé sa surface. Par rupture du ligament de ce bivalve au niveau de la charnière, nous disposerions alors de deux échantillons d'une même colonie tout en ayant diminué le stress appliqué à l'éponge.

La première partie de cette étude porte sur la comparaison de la composition chimique des tissus de *C. crambe* prélevés sur deux substrats distincts : substrat dur inerte et coquille d'*Arca noae*; puis sur la comparaison de la composition chimique des tissus prélevés sur chacune des valves de la coquille. La seconde partie expose les premiers essais de mise en œuvre de l'expérience de stress ainsi que les résultats préliminaires obtenus par analyse chimique des prélèvements.

Matériel et Méthodes

a) Comparaison de la composition chimique des tissus de *C. crambe* prélevés sur différents substrats : roche et *Arca noae*

Les échantillons de *C. crambe* sur roche et un mollusque *Arca noae* ont été collectés en plongée sous-marine en Octobre 2012 à une profondeur de 8 mètres (42° 28'915 N – 3° 08'200 E). Les tissus ont été prélevés, nettoyés à l'aide d'eau de mer filtrée stérile puis

congelés à -80°C. Après lyophilisation, les tissus ont été extraits selon le **protocole optimisé** puis analysés selon les **Conditions 1** (cf. Matériel et Méthodes – Généralités p 107).

b) Diminution du pH de l'eau environnante

Deux aquariums de capacité 8 litres ont été installés « en circuit ouvert », approvisionnés en eau de mer directement pompée dans la baie de Banyuls-sur-Mer à un débit : 2L/min (Pérez-Lopez et al. 2014).

Sept *Arca noae* recouverts de *C. crambe* ont été collectées début Novembre 2012 en plongée à une profondeur variant entre 5 et 8 mètres. Les bivalves ont ensuite été retirés de leur coquille. Puis les valves de la coquille ont été séparées au niveau de la charnière par rupture du ligament. Une valve a été placée dans le bac dit « contrôle négatif » ne subissant aucune modification du pH environnant, et la seconde correspondante dans le bac dit « contrôle positif – stress pH » dans lequel sera abaissé le pH de l'eau environnante (Figure 27). Les colonies ont été acclimatées un mois sans application de stress autre que la mise en aquarium. Après un mois d'acclimatation, les bacs ont été placés en circuit fermé deux fois par jour durant 2 heures. Durant ces 2 heures, le pH de l'eau environnante a été abaissé puis maintenu à 7 par bullage de CO₂ (système Aqua Medic CO₂ set professionnel®) dans le bac « contrôle positif – stress pH ». Le stress a été appliqué pendant une durée de 10 jours (expérience 1). La même expérience a été menée en parallèle avec une diminution plus importante du pH de l'eau environnante, abaissé puis maintenu à 6,0 par bullage de CO₂ (système Aqua Medic CO₂ set professionnel®) dans le bac « contrôle positif – stress pH ». Dans ce cas, le stress a été appliqué pendant une durée de 5 jours (expérience 2).

Les expériences sont représentées schématiquement dans la figure suivante (Figure 27):

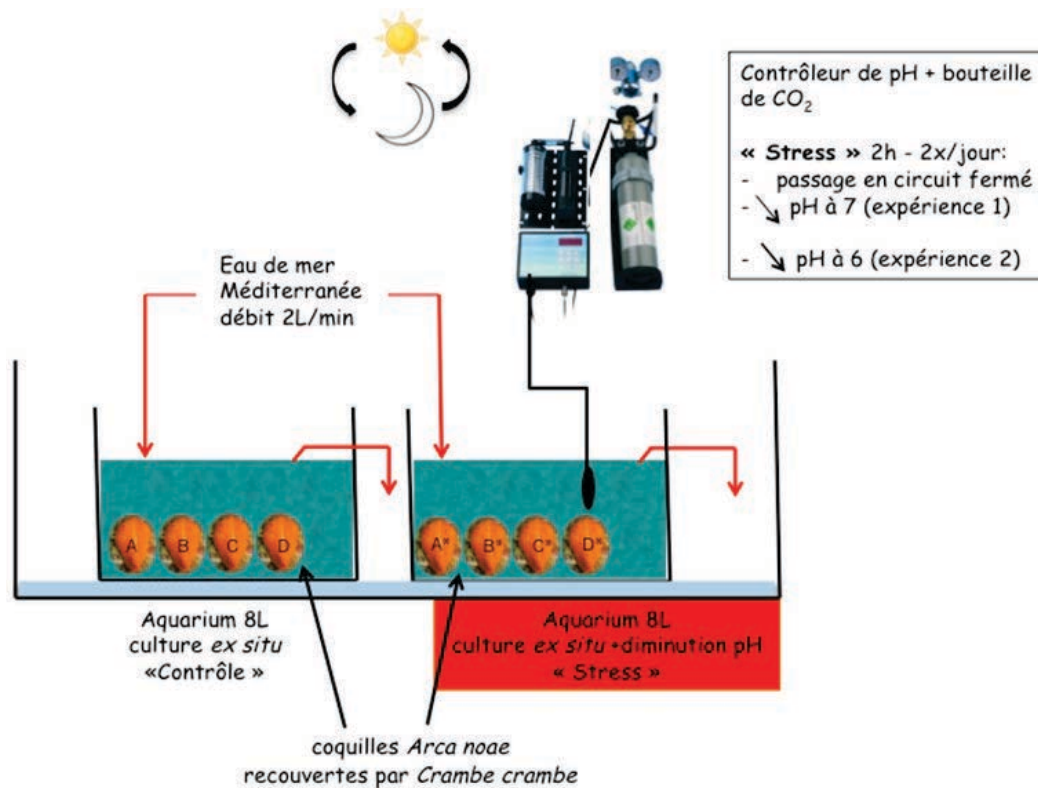


Figure 27. Explication schématique de l'expérience de stress en aquarium.

c) Prélèvements et traitement des échantillons de *C. crambe*

Chaque prélèvement consiste à retirer une valve du bac « contrôle négatif » et sa valve correspondante du bac « contrôle positif – stress pH », prélever des tissus de *C. crambe* la recouvrant, et les congeler à -80°C avant de les lyophiliser. Chaque échantillon a été extrait selon le **protocole optimisé** puis analysé selon les **conditions 1 et 2** (cf Matériel et Méthodes-Généralités p107 & 108).

Des tissus ont été également prélevés en vue d'extraire l'ADNr16S total (congélation à -80°C des prélèvements), mais également afin d'être analysés par CARD-FISH (sonde EUB338 pour le domaine des Bactéries et sonde BET467 marquées à la HRP pour la

bêtaprotéobactérie spécifique associée à *C. crambe*) (fixation des prélèvements dans du paraformaldéhyde 4%).

Afin d'étudier les effets de tels stress, les prélèvements ont été effectués aux temps suivants (Figure 28):

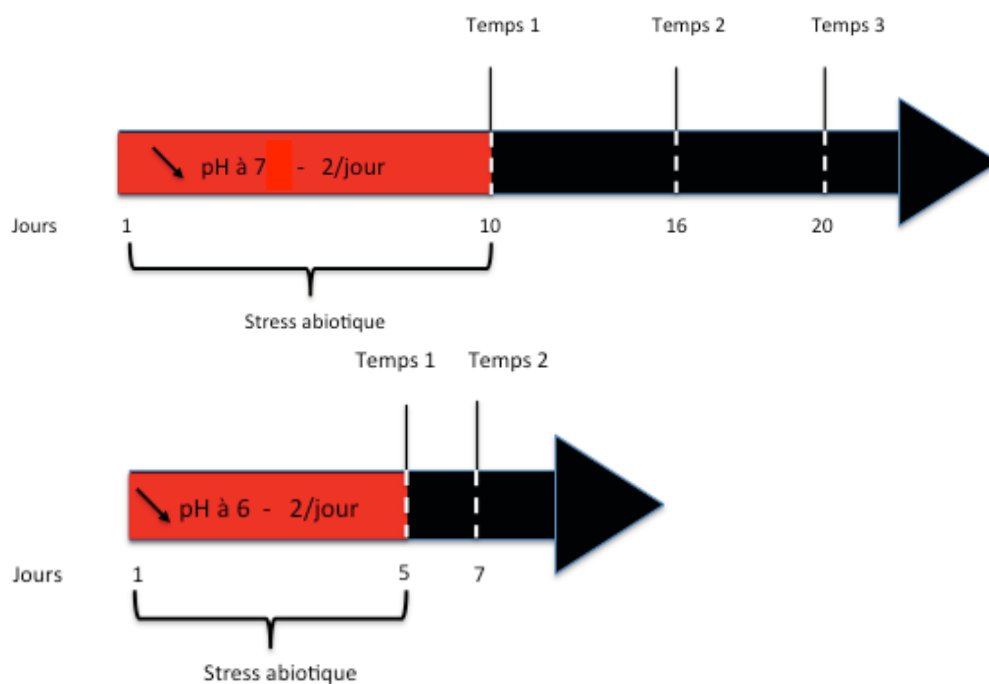


Figure 28. Temps de prélèvements pour les expériences de culture *ex situ* additionnées d'une diminution du pH environnant à 7.0 et à 6.0.

La comparaison des empreintes chimiques de *C. crambe* a été réalisée à 290 nm, par mesure des surfaces relatives de 12 pics calculées par rapport à la somme des surfaces des 12 pics (Figures 31 et 34 – annotations rouges) entre les conditions culture *ex situ* seule (pH mesuré à 8,1) d'une part, et accompagnée d'une diminution du pH d'autre part, de manière à mettre en évidence des différences dans les proportions relatives des composés correspondants. Etant donnée la complexité du profil et en tenant compte des analyses du chromatogramme obtenu par LC/MS (plusieurs masses trouvées pour un seul pic observé en UV), certains pics peuvent correspondre à

plusieurs alcaloïdes. Dans ce cas, il aurait été préférable de faire cette comparaison à partir des analyses en LC/MS mais les profils obtenus lors de ces expériences n'ont pu être exploités (problèmes techniques du spectromètre de masse au moment de cette expérience).

Résultats et discussion

a- Comparaison de la composition chimique des tissus de C. crambe prélevés sur différents substrats : roche et mollusque Arca noae

Dans les conditions d'analyse 1, les chromatogrammes des extraits de tissus d'éponges prélevés sur chacune des valves du mollusque sont pratiquement superposables (Figure 29) et sont comparables à l'empreinte chimique des tissus de *C. crambe* prélevés sur roche (cf. Figure 22).

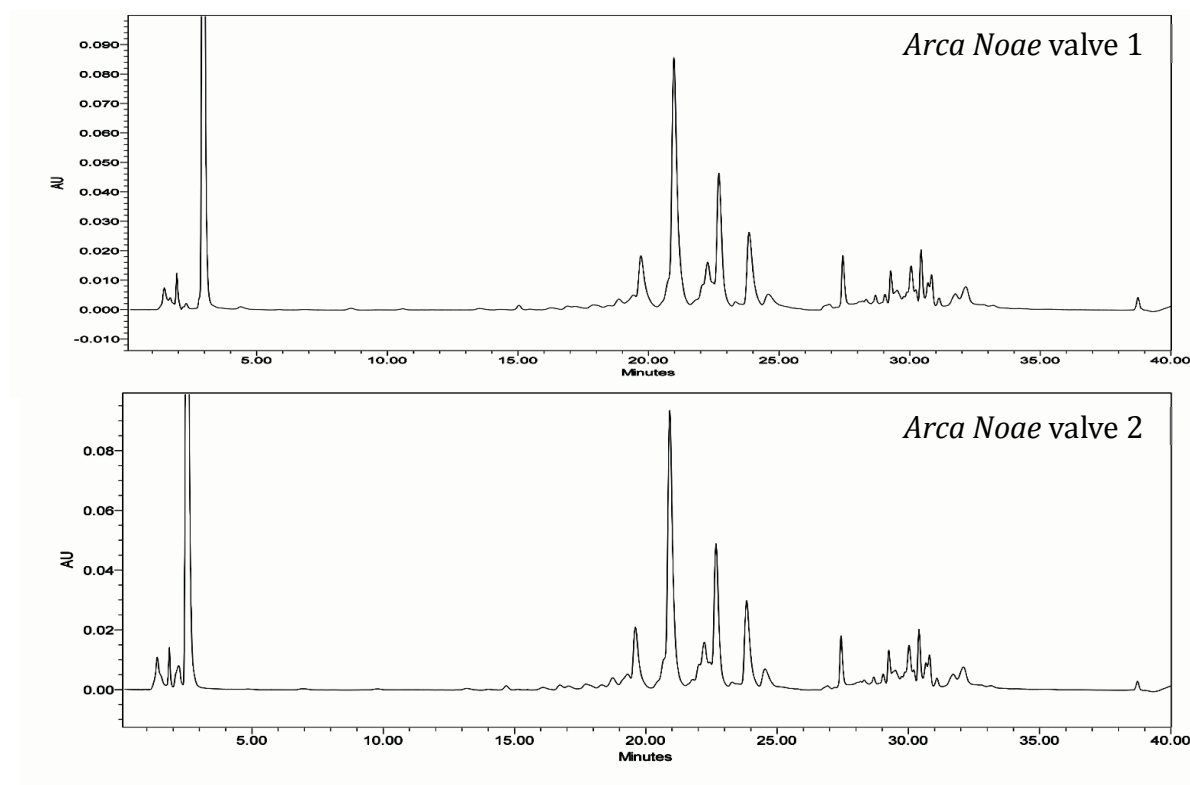


Figure 29. Chromatogrammes UV à 290 nm (Condition 1) des extraits de *C. crambe* recouvrant les deux valves d'un *Arca noae*.

De ce fait, le mollusque *A. noae* recouverte de tissus de *C. crambe* représentait un bon outil pour cette étude. Il devrait permettre à la fois une comparaison qualitative et quantitative de l'impact du stress constitué par la culture *ex situ* accompagnée d'une acidification de l'eau environnante, sur la composition chimique en alcaloïdes guanidiniques des tissus de *C. crambe*. L'expérience a donc été réalisée en utilisant les deux valves d'un même mollusque, l'une étant prélevée dans le bac témoin et l'autre étant prélevée après avoir subi le stress choisi.

b- Etude des empreintes chimiques des tissus de C. crambe après culture ex situ accompagnée d'une acidification du pH de l'eau environnante.

Expérience 1

Stress abiotique : diminution du pH de l'eau environnante à 7.0

En comparant, pour chaque temps l'empreinte du contrôle par rapport à celle du stress, on constate que la culture *ex situ* accompagnée d'un stress pH n'affecte pas l'ensemble des alcaloïdes de la même manière (Figure 32). Les différences les plus marquées sont observées au temps final de l'expérience. Les surfaces relatives des pics 3 et 10 ne sont pas modifiées en fonction des conditions de culture des colonies d'éponges. Les surfaces relatives de la majorité des pics et plus significativement des pics 4 et 7 sont elles, nettement augmentées, alors que d'autres pics et plus significativement les pics 6 et 11 diminuent (Figure 32). Des résultats similaires ont été obtenus aux temps 1 et 2 de l'expérience (Figure 30).

Bien qu'on observe une modification de l'empreinte chimique en condition de stress à pH 7, cela ne semble pas être suffisant pour provoquer des modifications majeures au

sein des extraits des tissus de *C. crambe*, en effet nous observons des variations aléatoires qui n'obéissent à aucune tendance nette pour aucun des pics dans la zone ciblée du chromatogramme. En l'absence de réplicats, on peut penser que ces variations pourraient être dues à une variabilité intracoloniaire. De surcroît, si on compare les 3 empreintes obtenues pour les contrôles, il est net qu'une variabilité intraspécifique (entre les colonies), indépendante du stress pH, est également observée.

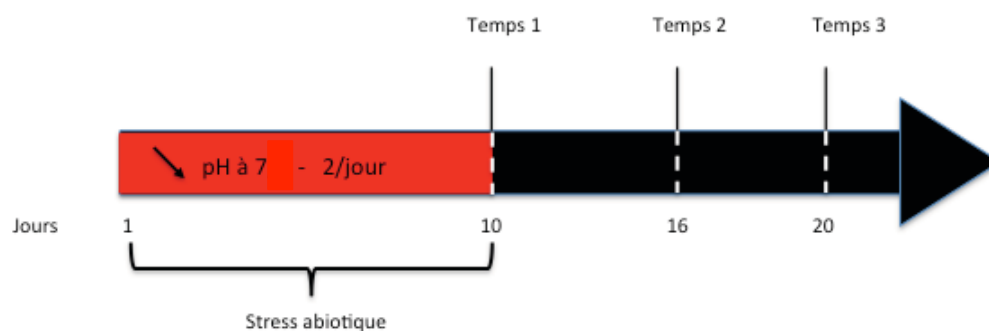


Figure 30. Rappel des temps de prélèvements pour l'expérience culture *ex situ* additionnée d'une diminution du pH environnant à 7.0.

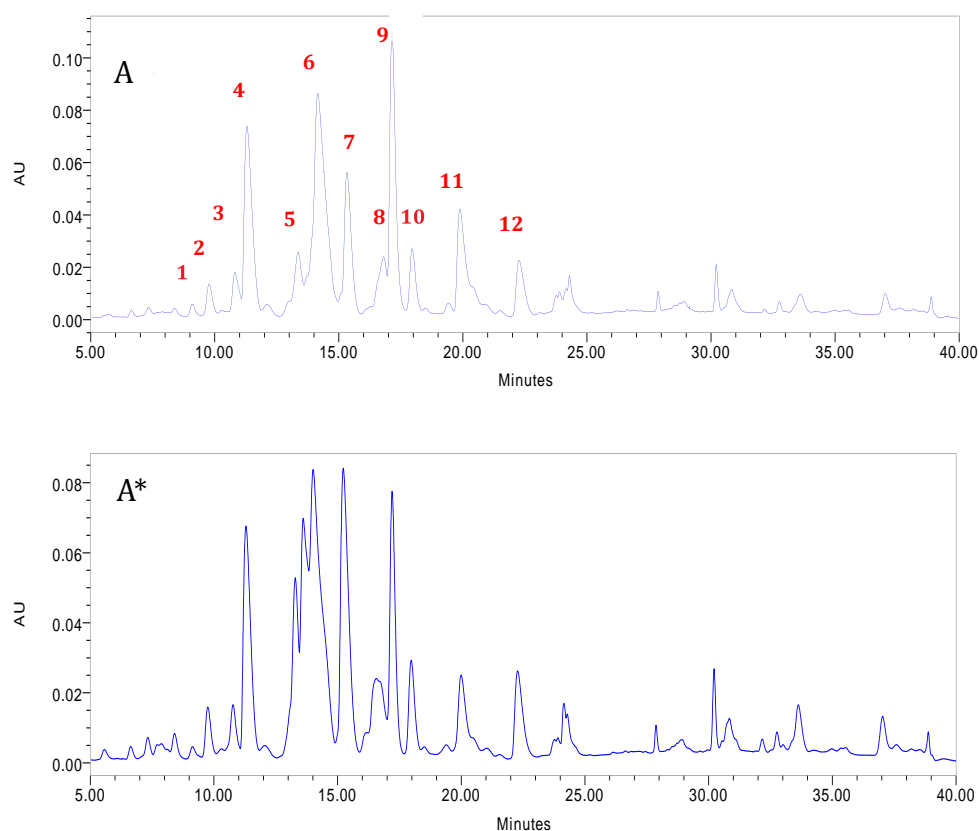


Figure 31. Exemple d'empreintes chimiques à 290 nm (conditions 2) d'une colonie sur une valve « contrôle » et sur une valve « stress » (pH 7.0) d'une même *Arca noe* au Temps 1 de l'expérience. A & A* Temps 1 de l'expérience / A: culture *ex situ* seule/ A*: culture *ex situ* additionnée d'une diminution du pH environnant à 7.0.

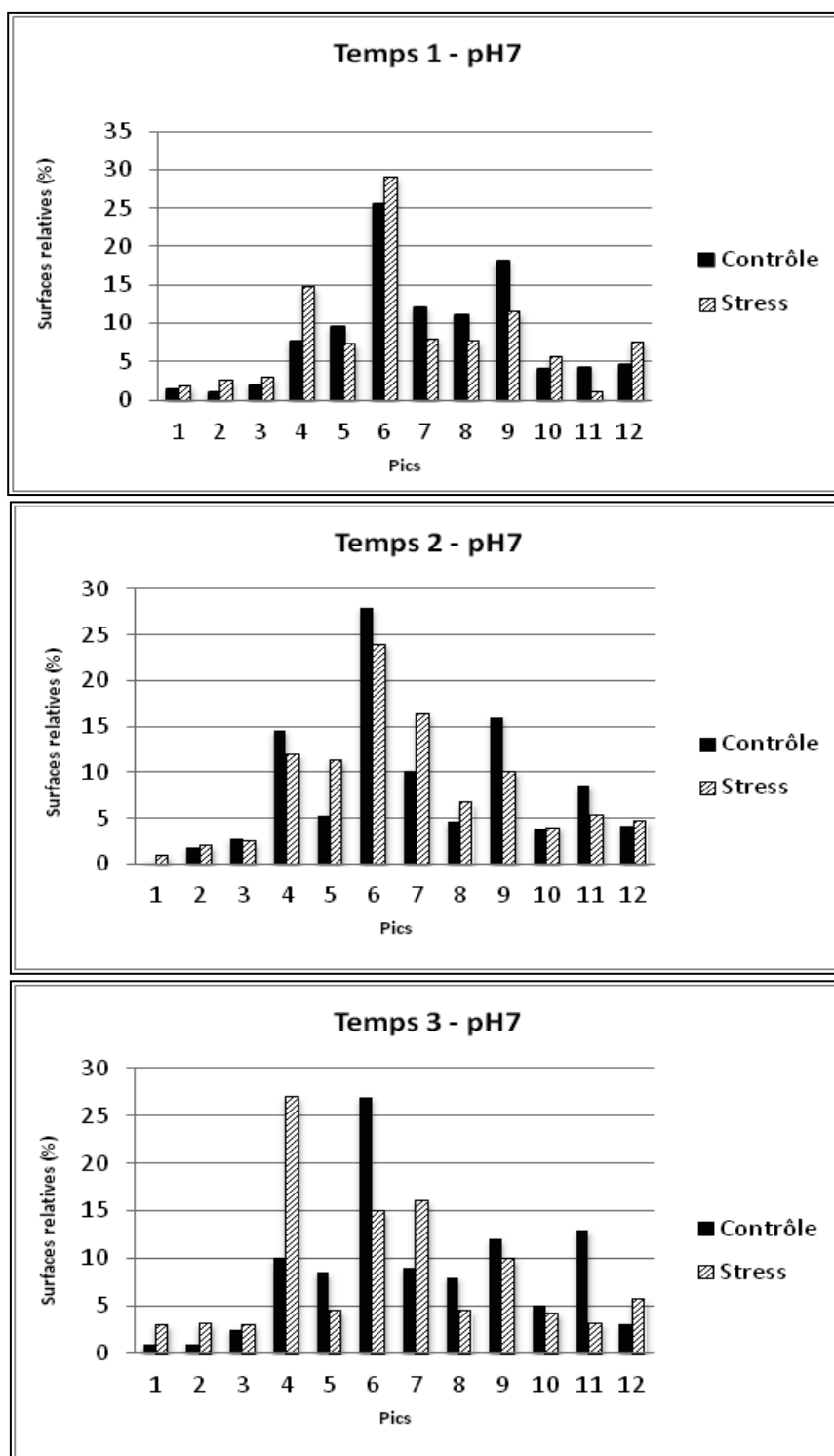


Figure 32. Evolution des surfaces relatives (%) des 12 pics sélectionnés après application d'un stress abiotique par diminution du pH de l'eau environnante à 7.0.

Expérience 2

Stress abiotique : diminution du pH de l'eau environnante à 6.0

Dans ces conditions, les résultats sont similaires aux deux temps de l'expérience (Figure 33). Les surfaces relatives de la majorité des pics, comme 8 ou 10, sont peu affectées. Les surfaces relatives des pics 6 ou 9 sont, elles, augmentées. Là encore, on peut penser qu'il s'agit d'une variabilité intracoloniaire indépendante du stress pH, d'autant plus que les pics affectés ne sont pas communs à ceux de l'expérience précédente. Là-aussi, une variabilité intraspécifique est observée, la plus nette étant observée pour le pic 11 au niveau des contrôles. Cependant le pic 7 a retenu notre attention car il semble être nettement affecté par cette diminution du pH : en effet, on note une diminution de plus de 95% de sa surface entre le « contrôle » et le « stress », et ce, aux deux temps de l'expérience (Figure 35). Bien que les chromatogrammes LC/MS correspondant à cette expérience ne soient pas exploitables, la présence de ce pic dans d'autres extraits d'éponges a permis de déterminer la masse du composé correspondant par LC/MS. Le spectre de masse en ESI⁺ présente un ion moléculaire à $[M+H]^+ = 511$ uma ce qui signifie que la masse de ce composé est 510 g.mol⁻¹. Aucun alcaloïde de cette masse n'a été décrit dans la littérature à ce jour (Base de données MarinLit 2012).

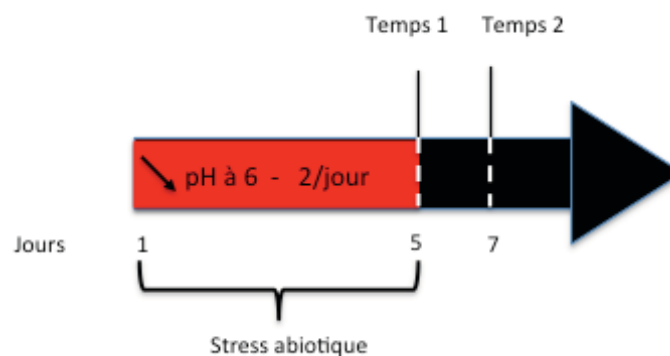


Figure 33. Rappel des temps de prélèvements pour l'expérience culture *ex situ* additionnée d'une diminution du pH environnant à 6.0.

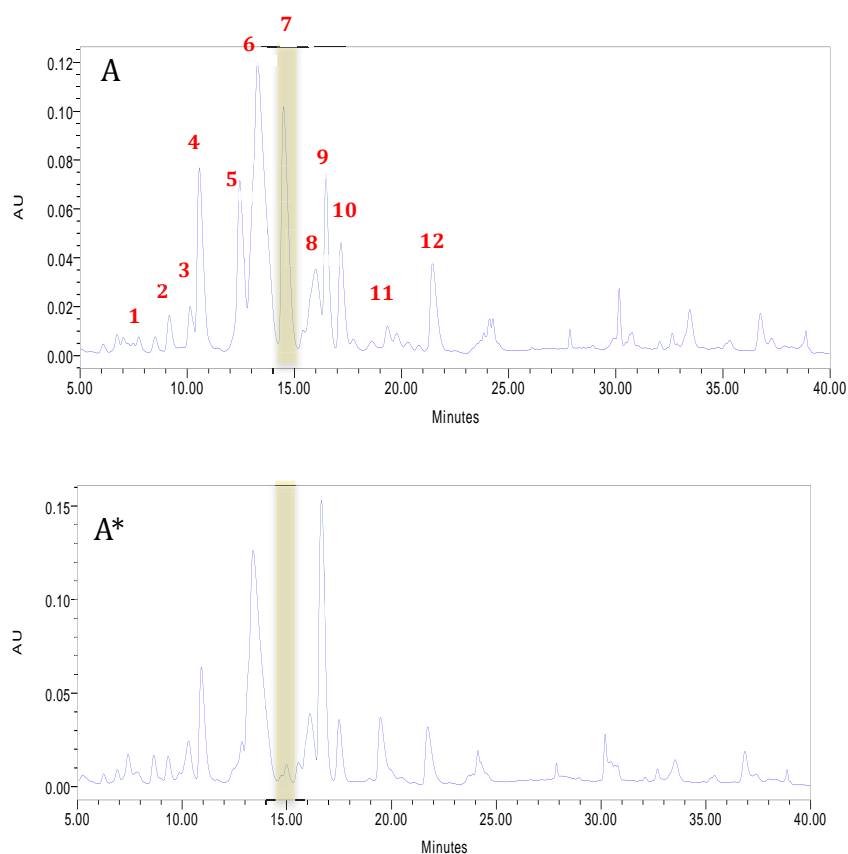


Figure 34. Comparaison des empreintes chimiques durant la culture *ex situ* de tissus de *C. crambe* additionnée de la diminution du pH de l'eau environnante à 6.0 (condition d'analyse 2) au Temps 1. A & A* Temps 1 de l'expérience= 5 jours/ B & B* Temps 2 de l'expérience= 7 jours/ A & B : culture *ex situ* seule/ A* & B* : culture *ex situ* additionnée d'une diminution du pH environnant à 6.0.

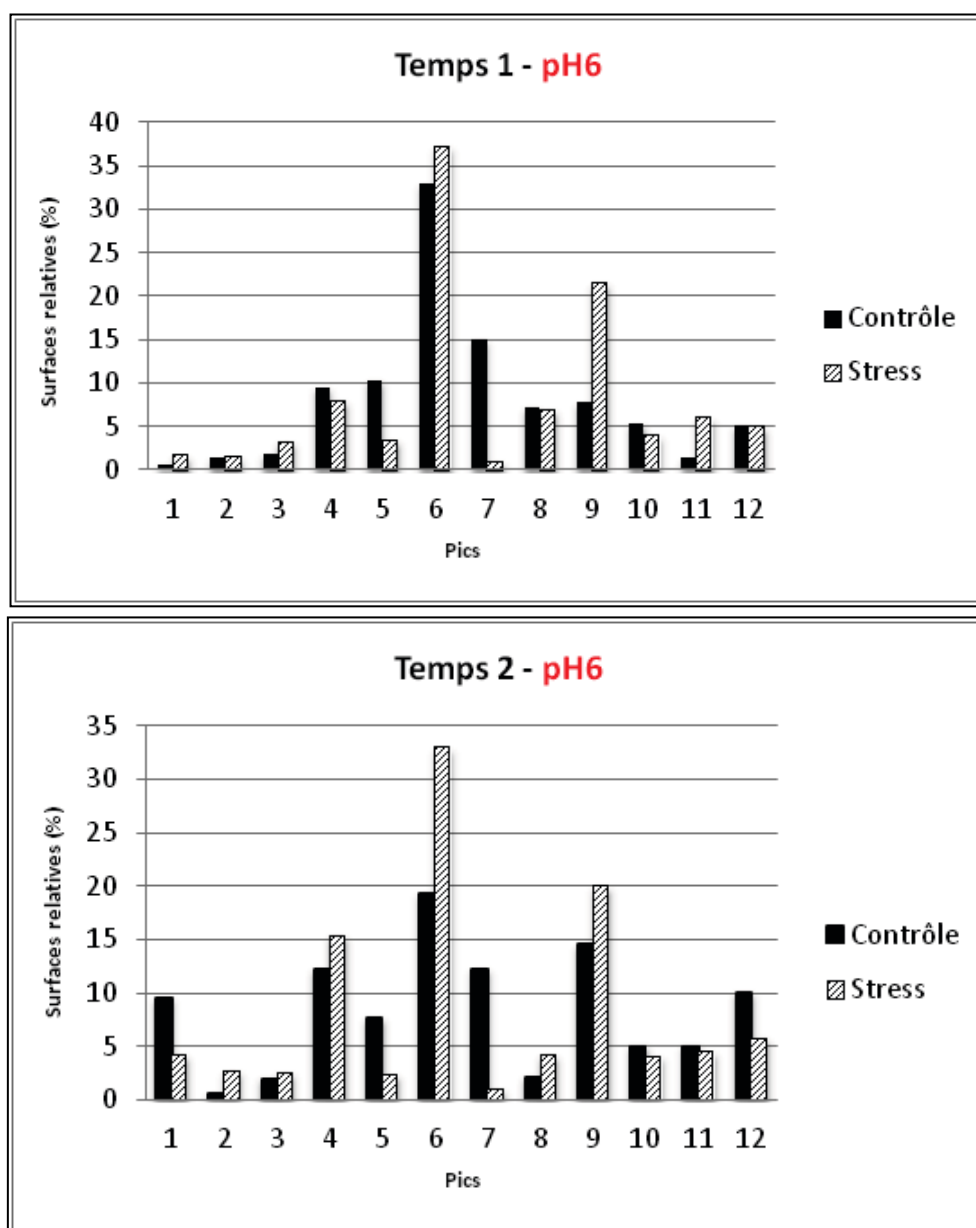


Figure 35. Evolution des surfaces relatives (%) des 12 pics sélectionnés après application d'un stress abiotique par diminution du pH de l'eau environnante à 6.0.

Conclusion

Ce travail est une expérience préliminaire dans la mise en place de l'étude de « stress en aquarium ». Elle a nécessité l'acclimatation de nombreuses éponges sur *Arca noae* en circuit d'eau de mer ouvert pendant plusieurs semaines afin de déterminer les conditions de survies, le temps et le pH optimal des expériences. Elle n'a donc pu, par conséquent, être menée en réplicats. Pour cette raison, les résultats préliminaires obtenus sont donc à considérer avec prudence. Cependant, nous avons pu mettre en évidence, sur les chromatogrammes en UV à 290 nm, et après culture *in situ*, une variabilité intraspécifique, voire même intracoloniaire dans les proportions relatives des alcaloïdes guanidiniques présents, qui n'est pas liée au stress pH appliqué. On peut penser qu'elle est due au stress lié aux conditions de vie *in situ*, mais cela resterait à démontrer. Cependant, cette variabilité pourrait être étudiée sur un grand nombre d'échantillons collectés et acclimatés, extraits et analysés en LC/MS avec les outils de métabolomique, mais cela dépasse l'objet de cette thèse. En effet, même si on ne peut écarter une possible implication des micro-organismes associés dans ces variations, il est beaucoup plus probable qu'il s'agisse ici d'un effet lié aux conditions environnementales de vie des éponges étudiées.

Cependant, pour le pic 7, on observe un effet très net du stress pH puisque sa surface diminue au moins de 95%. Il est possible d'envisager qu'il disparaît totalement puisque le pic résiduel observé en UV pour les éponges stressées peut correspondre à un composé minoritaire co-élué. Là encore, une analyse exploitable des TIC enregistrés aurait permis de savoir s'il s'agissait d'une réelle disparition. Dans ce dernier cas, nous pourrions parler d'une modification de l'empreinte chimique de l'espèce et donc

envisager qu'elle soit due à une modification de voie métabolique de l'éponge ou de ses micro-organismes associés conduisant à une altération de la voie de biosynthèse du composé correspondant à ce pic.

Nous avons également vérifié la stabilité de ce composé en faisant des injections répétées d'extraits d'éponges où il est présent et plusieurs ré-extractions de la même colonie à plusieurs semaines d'intervalle. Nous avons également montré qu'il n'était pas affecté par l'ajout d'acide dans le vial d'injection. Il s'agit donc bien d'un effet qui rend compte d'un processus biologique et pas d'une dégradation chimique de l'échantillon.

Ces résultats intéressants ont montré l'intérêt de répéter à l'avenir cette expérience de stress à pH 6.0 en triplicats avec une analyse microbiologique menée en parallèle sur tous les échantillons. Mais cela ne pouvait être envisageable lors de cette thèse. Cependant, comme nous disposions de matière biologique collectée lors de tous les travaux menés jusque-là, nous avons jugés utile d'établir la carte d'identité chimique de l'espèce présente à Banyuls-sur-Mer et de caractériser la structure du composé nouveau correspondant au pic d'intérêt mis en évidence lors de ce travail préliminaire.

Partie 3. Caractérisation des alcaloïdes guanidiniques de *C. crambe* prélevée à Banyuls-sur-mer

Introduction

Afin de mieux comprendre et interpréter les variations observées dans les empreintes chimiques des colonies étudiées, il nous a paru indispensable de caractériser les alcaloïdes guanidiniques correspondant aux différents pics présents sur les chromatogrammes CLHP/UV. Pour cela, des analyses en LC/MS d'extraits d'éponges ont été réalisées afin d'établir une carte d'identité chimique permettant de mieux étudier la variabilité intraspécifique observée.

Matériel et Méthodes

a. Carte d'identité chimique

Une ébauche de la carte d'identité chimique de la même colonie que celle de la figure 22 a été obtenue par analyses en LC/MS de l'extrait après optimisation des conditions d'ionisation en mode positif.

b. Purification et caractérisation structurale de l'alcaloïde de masse 510 g.mol⁻¹

La totalité des échantillons de *C. crambe* contenant le composé inconnu à purifier (11,80g) a été rassemblée puis lyophilisée. Ce matériel biologique a ensuite été extrait trois fois par un mélange dichlorométhane/méthanol (1/1 v/v) (3 x 40 mL + 3 x 10 min ultrasons) puis filtré sur papier filtre et évaporé à sec. L'extrait brut (1,01g) ainsi obtenu a été repris dans un minimum de mélange CH₂Cl₂/MeOH (1/1 v/v) en présence de 5 g de

silice greffée RP-18 (Septra C18-E (50 μm , 65Å) Phenomenex TM) pour être fractionné par chromatographie sous pression réduite sur silice greffée (Septra C18-E (50 μm , 65Å) Phenomenex TM) avec un gradient d'élution de polarité croissante constitué de méthanol et d'eau (Figure 36).

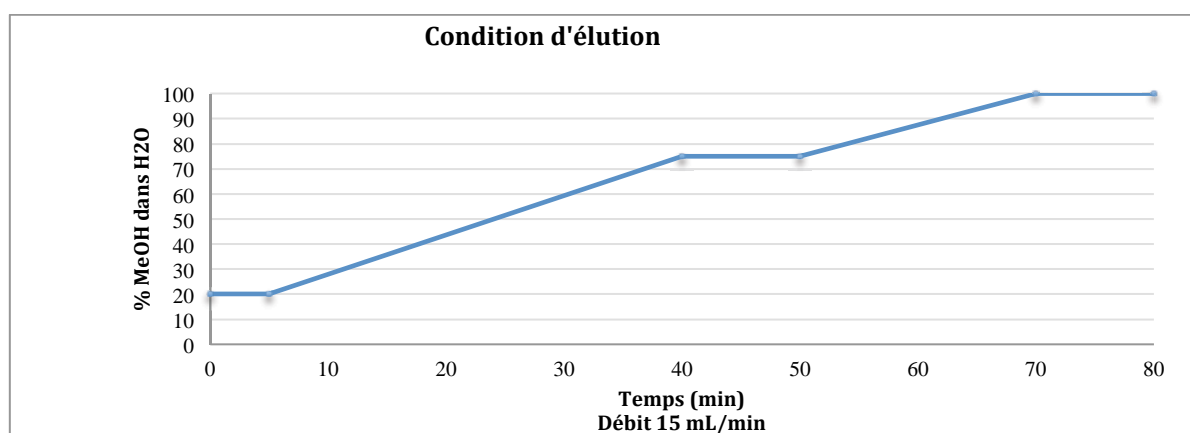


Figure 36. Gradient d'élution de la purification en flash chromatographie.

La chromatographie préparative sous pression réduite a été réalisée sur une chaîne La flash system VWR Internationale équipée d'un détecteur UV intégré et d'un collecteur de fractions FC 204 Gilson avec une cartouche Merck SVF D26-RP18-37g (40-63 μm). Les fractions ont été collectées à raison de 20 mL/tube.

Les fractions éluées avec 50% d'eau (F19 et F20) de masses respectives 19,2 et 19,8 mg ont été purifiées en CLHP semi-préparative à la concentration de 20 mg/mL dans le méthanol. La chromatographie semi-préparative a été réalisée sur une chaîne équipée de pompes binaires Waters 1525 et d'un détecteur UV à double longueur d'onde Waters 2487 avec une colonne Uptisphere (250 x 10 mm, 5 mm) Phenomenex TM. Le résidu obtenu (environ 4 mg) a été purifié à la concentration de 2 mg/mL dans le méthanol par injections successives de 60 μL en CLHP sur colonne analytique Gemini C18 (150 x 3 mm, 5 μm) PhenomenexTM dans les conditions 2 mais avec retour aux conditions

initiales (sans lavage de la colonne avec 100% d'acétonitrile) au bout de 20 minutes.

Moins d'un mg de composé a pu être purifié.

Les spectres de RMN du composé 510 ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 500 MHz à gradient de champs équipé d'une cryosonde (collaboration avec C. Long – Institut de recherche Pierre Fabre-Toulouse) Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au solvant deutéré (CD₃OD) utilisé comme étalon interne. Les constantes de couplage (**J**) sont exprimées en Hertz et la multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes : **s** (singulet), **d** (doublet), **t** (triplet), **m** (multiplet).

Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus sur un spectromètre à temps de vol, Bruker Daltonics microTOF-LC à source ESI (collaboration avec C. Long – Institut de recherche Pierre Fabre -Toulouse)

Résultats et discussion

a- Construction de la carte d'identité chimique.

L'analyse de l'extrait provenant de la même colonie que celle de la figure 23 est donnée ci-dessous (Figure 37).

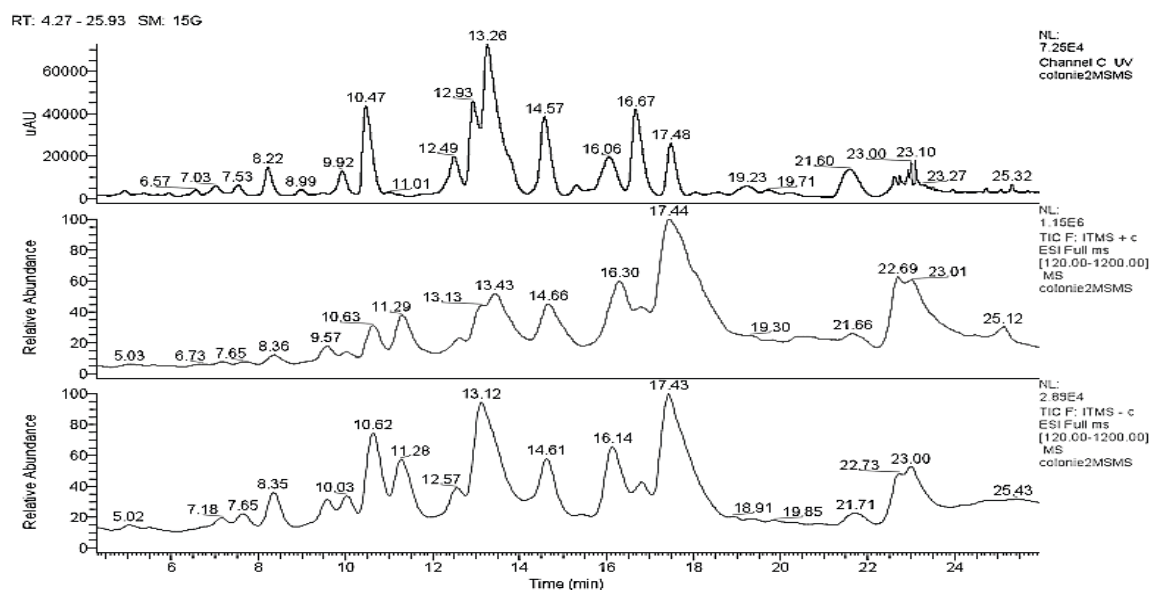


Figure 37. Chromatogramme d'un extrait de *C. crambe* (colonie 2) analysé sur colonne Gemini C18 (Conditions 2) avec détection UV à 290 nm et en spectrométrie de masse en modes d'ionisation positive et négative.

La mise au point des conditions d'analyse en LC/MS a permis de caractériser une partie des alcaloïdes présents dans les extraits de *C. crambe* et de passer de l'empreinte chimique des colonies récoltées à l'ébauche d'une carte d'identité chimique (Figure 38).



Dans les conditions d'ionisation utilisées (voir Matériel et Méthodes), les alcaloïdes à noyau pentacyclique de type crambescidines (cf. Figure 9) sont caractérisés, en mode d'ionisation positive, par des ions mono- et multi-chargés à $m/z = [M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ et $[M+3H]^{3+}$, alors que ceux qui ont des structures de type crambescines (cf. Figure 9) présentent des ions mono- et bi-chargés à $m/z = [M+H]^+$ et $[M+2H]^{2+}$. Ils s'ionisent également en mode négatif mais l'intensité des ions est moindre et on observe dans ce cas des adduits $[M+AF-H]^-$ avec l'acide formique. Des exemples sont donnés en annexes 3 et 4.

Ainsi, des 4 crambescidines et des 11 crambescines décrites chez *C. crambe* (Bondu et al., 2012) nous avons pu identifier 3 crambescidines et 8 crambescines. Cependant, la carte d'identité est loin d'être complète puisque au moins 8 alcaloïdes de type crambescidines et 13 alcaloïdes de type crambescines restent à caractériser. Parmi eux, nous trouvons une série de composés dont les masses diffèrent de 14 uma, ce qui correspond à un groupement méthylène, à $m/z = 497$, $m/z = 511$, $m/z = 525$ et $m/z = 539$. Selon une communication personnelle d'Olivier Thomas (Université de Nice), les deux derniers sont présents également dans des extraits de *C. crambe* collectés à Nice.

Pour les raisons que nous avons mentionnées dans la partie de ce chapitre consacrée à l'expérience de stress pH en aquarium, notre attention s'est plus particulièrement portée sur le composé de temps de rétention 14,88 minutes dont les spectres full scan en ESI⁺ et ESI⁻, sont donnés ci-après (Figure 39).

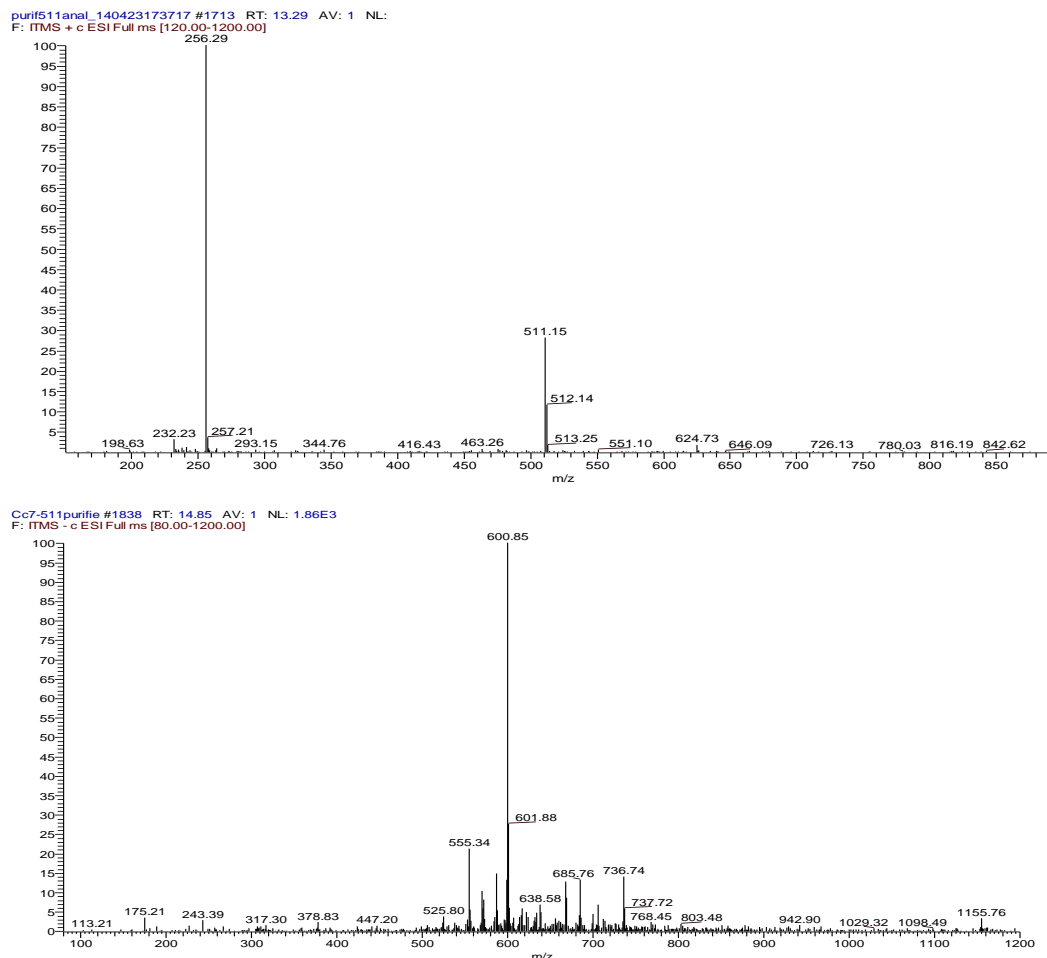


Figure 39. Spectres de masse (ESI⁺ en haut et ESI⁻ en bas) du composé de temps de rétention 14,8 mn.

Le spectre de masse en mode positif présente des ions mono- et bi-chargés à $m/z = 511$ $[M+H]^+$ et $m/z = 256$ $[M+2H]^{2+}$. En mode négatif, on observe un ion à $m/z = 601$ correspondant à un adduit d'acide formique $[M+2AF-H]^-$. La masse du composé est donc de 510 g.mol^{-1} et il s'apparente à une structure de type crambescine.

b- Purification et caractérisation structurale de l'alcaloïde de masse 510 g.mol^{-1}

Tous les échantillons lyophilisés de *C. crambe* contenant le composé inconnu à purifier (11,80g) ont été rassemblés. L'extrait brut obtenu par extraction avec un mélange de méthanol et de dichlorométhane a été analysé en CLHP (Figure 40), puis fractionné par

flash-chromatographie en phase inverse (dépôt solide) dans un gradient continu d'eau et de méthanol.

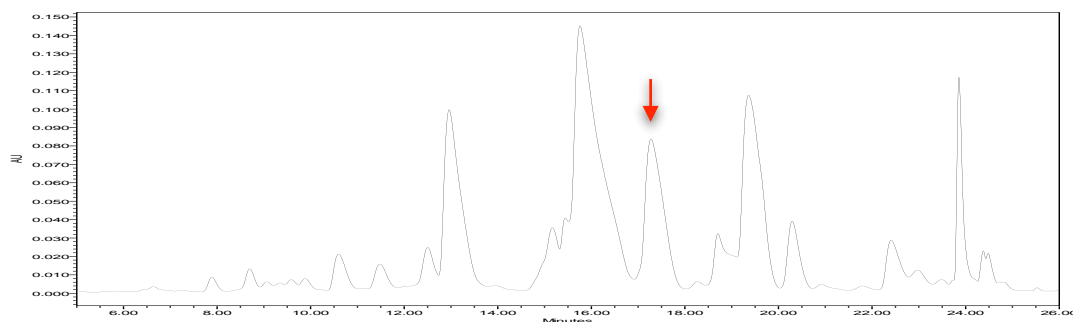


Figure 40. Chromatogramme CLHP (conditions 2) de l'extrait brut de *C. crambe*.

Les fractions éluées entre 15 et 30 minutes avec une proportion d'eau allant de 60 à 40 % dans le méthanol ont été analysées par CLHP-UV-ELSD analytique dans les conditions 2. Les chromatogrammes sont présentés ci-après dans la figure 41. Les analyses en LC/MS montrent que les fractions F19 et F20 éluées avec 50% d'eau contiennent toutes deux le composé à purifier.

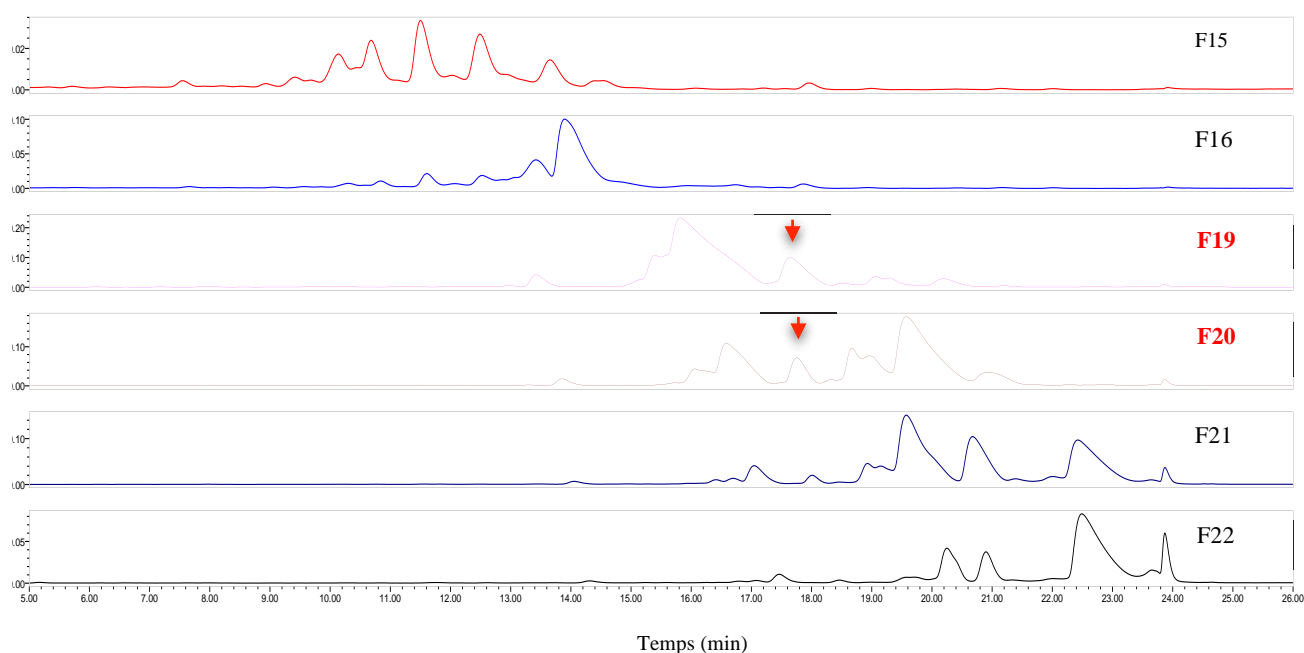


Figure 41. Chromatogrammes CLHP des fractions 15, 16, 19, 20, 21 et 22 à 290 nm.

Le composé d'intérêt a été purifié à partir de ces deux fractions, en CLHP en phase inverse sur une colonne de silice greffée C-18 semi-préparative, puis sur une colonne analytique Gemini C-18 utilisée dans les conditions 2 modifiées (contrôle analytique en annexe 5).

Moins d'un milligramme de composé de masse 510 g.mol^{-1} a pu être ainsi purifié. Le spectromètre de RMN (400 MHz) disponible sur le plateau 5 de la plateforme Bio2Mar au CRIOBE ne permettait pas de caractériser ce composé. L'étude structurale a pu être entreprise en collaboration avec Christophe Long, ingénieur de recherche du centre R. & D. de l'institut de recherches Pierre Fabre situé sur le campus de l'Oncôpole à Toulouse qui a réalisé les spectres de RMN et le spectre de masse haute résolution (Annexe 6).

La formule brute obtenue à partir de l'analyse HRESIMS (+) correspond à $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{O}_2^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $m/z = 511,3740$ (calculé pour le rapport m/z 511,3755 uma). Le degré d'insaturation calculé à partir de cette formule brute est de 10. Pour toutes les crambescines décrites dans la littérature à ce jour (Annexe 1), le nombre maximum d'insaturations est de 6 pour les crambescines A (4 insaturations et 2 cycles). La présence d'insaturations sur une des chaînes carbonées pouvait permettre d'expliquer ce haut degré d'insaturation.

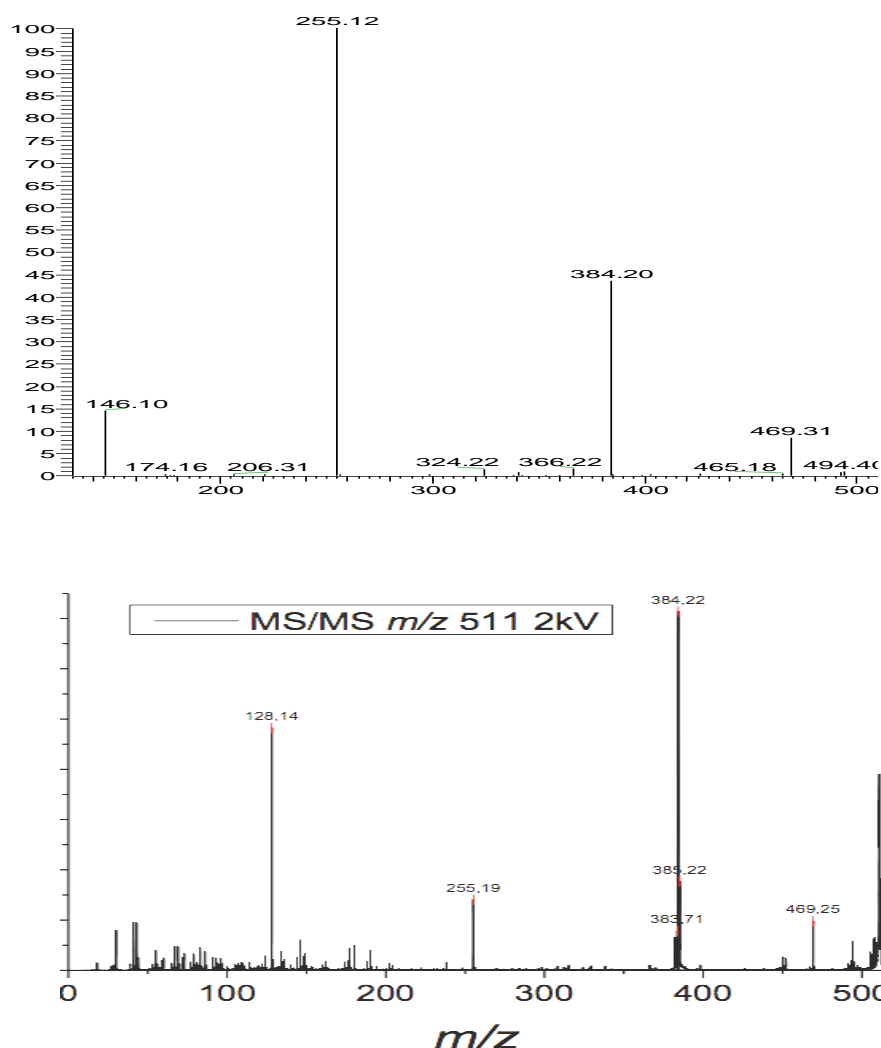


Figure 42. Spectres de fragmentation obtenus à partir de l'ion à $m/z = 511$ en ESI+ (en haut) et en MALDI-TOF (en bas).

L'analyse des spectres de fragmentation MS/MS obtenus en LC/MS (ESI+) et du spectre MS/MS obtenu en MALDI-TOF sur l'ion à $m/z = 511$ (Figure 42), ainsi que l'étude des profils de fragmentations des crambescine A, B et C (Bondu et al., 2012 ; G. Genta-Jouve et O. Thomas article en préparation), nous ont amenés à proposer la structure et le profil de fragmentation représentés sur la figure 43.

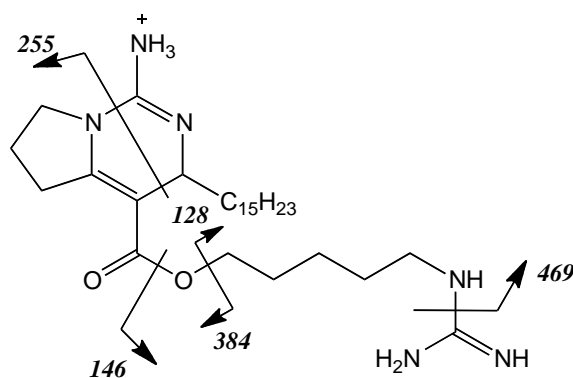


Figure 43. Hypothèse structure et fragmentations du composé isolé.

L'alcaloïde isolé est de type crambescine A, avec une chaîne inférieure guanidynoalkyle à 5 atomes de carbones ($m = 5$) et une chaîne supérieure alkyle en 15 atomes de carbone comportant 4 insaturations. Le spectre de RMN du proton (Figure 44) étant difficile à interpréter étant donné la très faible concentration de l'échantillon, nous avons choisi de l'analyser en le comparant à celui de la crambescine A2 et aux données de la littérature (Annexe 7) (Bondu et al., 2012).

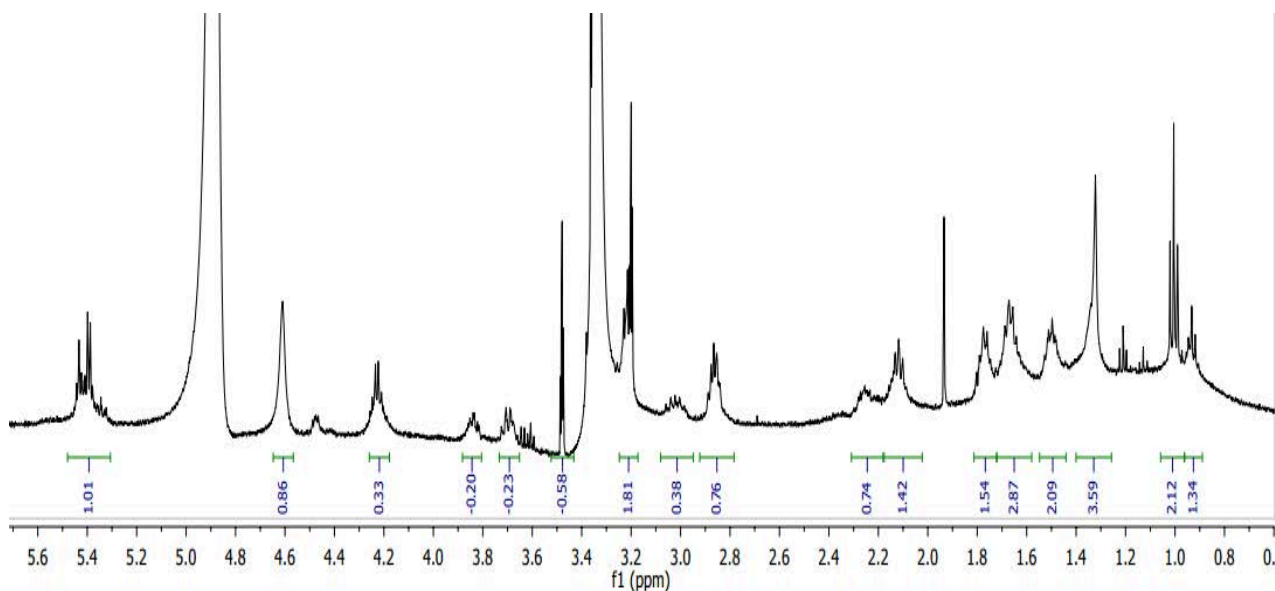


Figure 44. Spectre de RMN du composé isolé (500 MHz, CD_3OD).

Le spectre du composé isolé présente des similitudes avec le spectre de la crambescine A2 mais on observe cependant deux différences principales significatives lors de l'analyse globale des signaux (Tableau 6) :

- le signal à 1,3 ppm correspondant aux protons des groupements méthylènes de la chaîne aliphatique supérieure est bien moins intense sur le spectre du produit isolé,
- on observe des signaux à 5,45 ppm et 2,85 ppm qui ne sont pas sur le spectre de la crambescine A2 et correspondent respectivement à des protons éthyléniques et à des méthylènes intercalés entre des doubles liaisons (Barison et al., 2010a). Cette hypothèse est confirmée par des corrélations entre ces signaux sur le spectre COSY H-H donné en annexe 8. La géométrie des doubles liaisons n'a pu être déterminée par mesure des constantes de couplage sur le spectre obtenu.

Tableau 6 : Données de RMN du proton de la crambescine A2 (Bondu et al., 2012) et du composé isolé (CD₃OD, 500 MHz). nd : non déterminé.

N° H	δ en ppm	
	Crambescine A2	Composé isolé
2	3,23	3,21
3	1,68	1,68
3A		1,50
4	1,75	1,77
5	4,25 et 4,22	4,21
9	2,99 et 3,33	3,02 et 3,3
10	2,11 et 2,23	2,10 et 2,25
11	3,67 et 3,82	3,70 et 3,85
13	4,40	4,47 ? (faible intensité)
14	1,56	nd
15	1,41	nd
16	1,30	5,30 – 5,50
17, 19, 20, 22, 23	1,25 – 1,35	5,30 – 5,50
18, 21, 24	1,25 – 1,35	2,85
25	0,9	5,30 – 5,50
26		5,30 – 5,50
27		2,09
28		0,9

Des corrélations observées sur le spectre COSY H-H ont également permis de construire deux autres systèmes de spins qui confirment la structure proposée par l'analyse de la fragmentation en spectrométrie de masse. Bien que l'intégralité des protons n'ait pu être attribuée (Tableau 6), nous proposons l'hypothèse de structure présentée ci-après en précisant que la position et la géométrie des doubles liaisons restent à confirmer (Figure 45). Nous avons préféré la géométrie Z qui rend compte de celle des acides gras polyinsaturés d'origine marine reportés dans la littérature (MarinLit 2012).

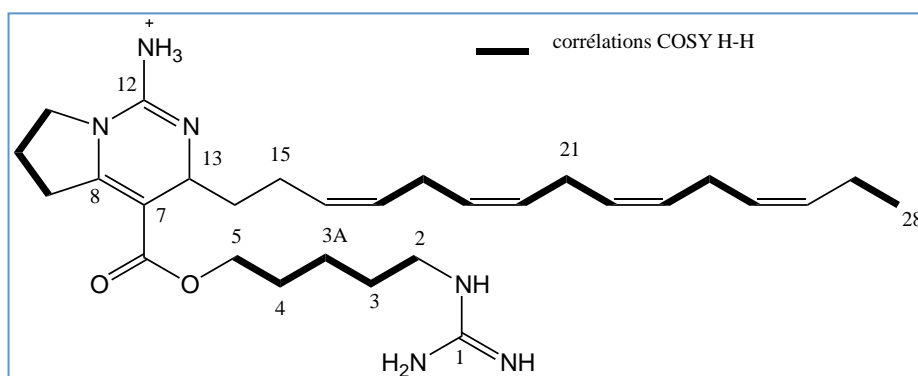


Figure 45. Hypothèse structurale proposée pour le composé isolé (numérotation selon Bondu et al. 2012).

Des expériences de RMN du ^1H , du ^{13}C et des expériences de RMN 2D ne seront envisageables qu'à partir de plus grandes quantités de produit. Il sera donc nécessaire de refaire une purification à partir de l'éponge.

Il faut également rappeler que des composés apparentés ont été observés dans les extraits (en spectrométrie de masse ESI+ et en MALDI-TOF) à $m/z = 497$, $m/z = 525$ et $m/z = 539$, correspondant à des différences d'un groupement méthylène sur la chaîne inférieure guanidynoalkyle (Figure 46).

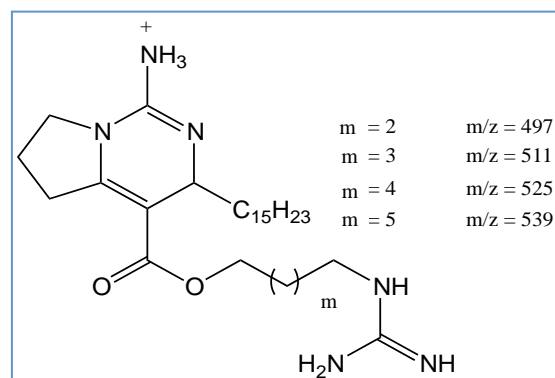


Figure 46. Hypothèses de structures des alcaloïdes à chaîne polyinsaturée de *C. crambe*.

En extrayant sélectivement ces masses du courant ionique total obtenu en LC/MS (ESI⁺), on remarque que chacun d'entre eux est présent deux fois à des temps de rétention distants de 3 minutes (Figure 47).

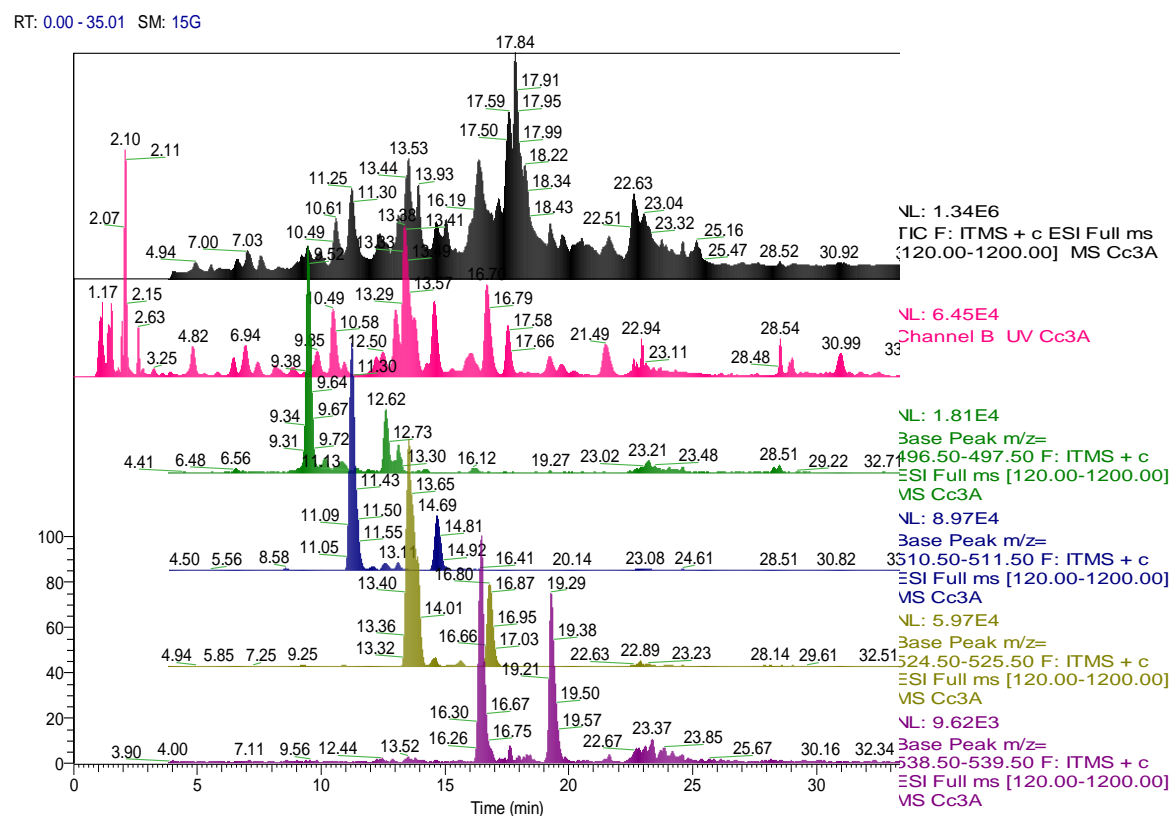


Figure 47. Chromatogrammes extraits du TIC en sélectionnant les ions à m/z = 497, 511, 525 et 539.

Ayant tout d'abord pensé à l'existence de formes plus ou moins protonées en fonction du pH, nous avons rejeté cette hypothèse en constatant que nous observions le même phénomène après acidification de l'échantillon injecté. Pour le composé de masse 510 g.mol⁻¹ isolé, on remarque nettement que le premier pic au temps de rétention 11 minutes n'absorbe pas en UV à 290 nm alors qu'il est détecté par spectrométrie de masse et ELSD. Il faudra donc essayer de le purifier à partir des fractions plus polaires obtenues en flash-chromatographie et comparer les données spectrométriques avec celles du composé élué 3 minutes plus tard. Cette série d'alcaloïdes à chaîne insaturée devra être considérée avec attention lors de l'analyse des résultats d'une nouvelle expérience de stress pH.

Partie 4. Etude in situ de la distribution spatiale des métabolites secondaires de l'éponge *C. crambe* par imagerie en MALDI-TOF

Article en préparation:

Analysis of alkaloids from the Mediterranean sponge Crambe crambe by mass spectrometry imaging.

Quentin Vandellingen, Julie Croué, Nataly Bontemps, David Touboul, Laurence Besseau, Bernard Banaigs, Marcelino Suzuki and Alain Brunelle.

Préambule

Comme introduit dans le Chapitre précédent (Chapitre 2), il est extrêmement difficile d'attribuer, par l'utilisation de techniques dépendantes de la culture, la synthèse d'un (de plusieurs) métabolite(s) secondaire(s) à un partenaire d'une symbiose. L'utilisation d'approches indépendantes de la culture, comme la séparation par gradient de densité des différents types cellulaires constitutifs d'une symbiose et analyse chimique de chacune des fractions obtenues, ont quant à elles permis d'émettre des hypothèses quant à l'organisme ou type cellulaire intervenant dans le stockage et la synthèse des métabolites d'intérêts (*cf. Chapitre 1. Etat de l'Art*). C'est par cette approche que fut localisée la toxicité de *C. crambe* au sein de cellules sphéruleuses (Uriz et al., 1996). Les cellules sphéruleuses semblent alors être le lieu du stockage des métabolites bioactifs de *C. crambe* (Uriz et al., 1996 ; Becerro et al., 1997).

Les cellules sphéruleuses sont de larges cellules renfermant de nombreuses inclusions

sphériques ou ovoïdes remplissant l'essentiel du volume cytoplasmique. Deux types sont observés : le premier type renfermant des inclusions sphériques apparaissant colorées (brunâtre) lors de l'observation en microscopie optique, ou encore denses aux électrons lors de l'observation en microscopie électronique (Figure 48), et le second type présentant des inclusions non colorées ou encore claires aux électrons. Plusieurs études rapportent que les cellules sphéruleuses stockeraient les métabolites secondaires d'éponges, c'est le cas chez *Aplysina fistularis* (Thompson et al., 1983) ou encore *Dysidea avara* (Müller et al., 1986).

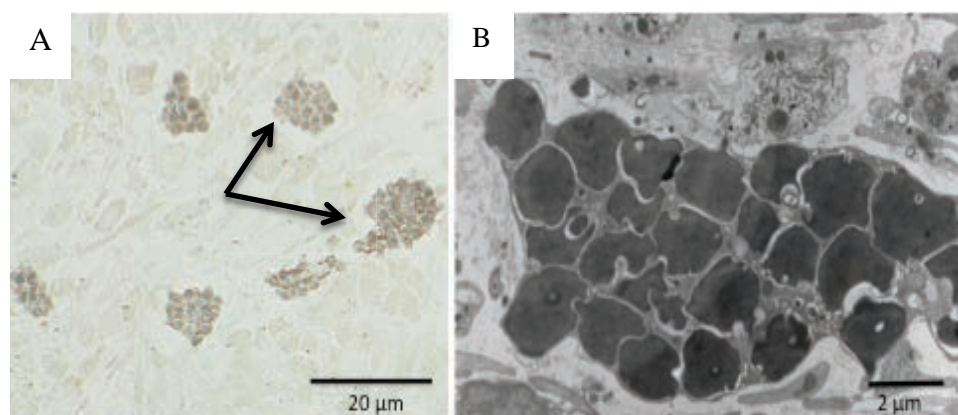


Figure 48. Cellules sphéruleuses observées à l'aide d'un microscope optique (flèches noires) **(A)** et d'un microscope électronique **(B)**. Photo : Julie Croué.

Bien que la toxicité de *C. crambe* ait été localisée au sein des cellules sphéruleuses, les auteurs n'ont cependant pas démontré que cette activité était due à la présence des alcaloïdes guanidiniques, aucune analyse chimique de ces cellules n'ayant été réalisée.

De récentes avancées, telles que la spectrométrie de masse MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) mais également la spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) permettent de caractériser la distribution spatiale ainsi que

l'abondance relative des produits naturels *in situ*, directement à la surface de fines sections de tissus. Il a été montré l'utilité de ces techniques dans la détermination de la localisation de métabolites secondaires au sein d'association micro-organismes-invertébrés comme dans le cas des micro-organismes et des éponges marines (Esquenazi et al., 2008 ; Simmons et al., 2008). L'étude de la répartition des métabolites secondaires au sein d'un organisme donne des informations sur leur rôle mais également des pistes quand à l'organisme (dans le cas des associations) ou le(s) type(s) cellulaire(s) responsable(s) de leur synthèse. La distribution spatiale des métabolites secondaires de *Dysidea avara* (Esquenazi et al., 2008) mais également de *Stylissa flabellata* (Yarnold et al., 2012) a ainsi été étudiée. Ces études montrent que les éponges présentent différents micro-environnements chimiques au sein de leurs tissus. La forte concentration d'un métabolite dans une région donnée laisse supposer que la biosynthèse de celui-ci s'effectue dans cette micro-région et ainsi quelle est réalisée par un type cellulaire concentré dans cette zone (Yarnold et al., 2012).

Au cours de cette étude, plusieurs sections de tissus de *C. crambe* ont été analysées par imagerie en spectrométrie de masse (MALDI-TOF et TOF-SIMS) afin d'analyser *in situ* la distribution spatiale des différents produits naturels caractéristiques de cette éponge marine. Par cela, nous avons cherché à visualiser les différences de composition chimique (ions produits) entre 3 micro-régions de l'éponge : le pinacoderme (où sont concentrées les cellules sphéruleuses), le mésohyle (où sont localisés les micro-organismes associés à *C. crambe*) et les chambres choanocytaires. Les expériences de spectrométrie MALDI-TOF et TOF-SIMS ont été réalisées à l'Institut de

Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette en collaboration avec Quentin Vanbellinghen (doctorant) et Alain Brunelle (directeur de recherche CNRS).

La préparation des échantillons est l'étape la plus critique dans la détermination de la distribution spatiale des métabolites (Yarnold et al., 2012). Les déchirures des tissus lors de l'utilisation du cryotome doivent être impérativement évitées car elles pourraient être confondues par exemple avec des chambres choanocytaires et entraîner des erreurs d'interprétation. Ainsi pour chaque échantillon, différentes techniques de fixation ont été testées, afin de déterminer celle permettant d'obtenir les sections de tissus de meilleure qualité sans affecter l'ionisation de l'échantillon.

Présentation des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse utilisées au cours de cette étude

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time-Of-Flight : MALDI-TOF

Le spectromètre de masse MALDI-TOF, introduit en 1988 par Hillenkamp et Karas est un instrument utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation), couplé un analyseur à temps de vol (TOF, Time-Of-Flight). Cette méthode d'ionisation a permis l'analyse de molécules de hautes masses moléculaires (1 000 000 u). L'échantillon à analyser est mélangé à une concentration importante de matrice (de faible poids moléculaire) possédant une forte absorption à la longueur d'onde du laser. La matrice est l'élément primordial de ce système. Suivant le type de matrice utilisée (parmi-elles : Acide sinapinique (SA) (Beavis et Chait, 1989), Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)(Beavis et al., 1992) et

l'Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)(Strupat et al., 1991)), différentes classes de molécules à différentes résolutions et seuil de sensibilité vont pouvoir être analysées. L'évaporation de cette solution conduit à la co-cristallisation matrice-analyte. L'irradiation par le faisceau laser pulsé conduit à l'absorption des photons par les molécules de matrice, induisant l'excitation électrostatique de celle-ci puis sa désorption et son ionisation. Les molécules de la matrice ionisées transfèrent (transfert intramoléculaire) une partie de leur charges aux molécules d'analytes, les ionisant à leur tour tout en les protégeant de l'énergie disruptive du laser (Figure 49). En effet, la matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident. Les ions ainsi formés seront accélérés dans un champ électrique qui les dirigera vers l'analyseur. L'analyseur permet de séparer et classer les ions selon leur temps de vol en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Les spectres de masse obtenus représentent l'intensité des ions émis en fonction du rapport masse/charge.

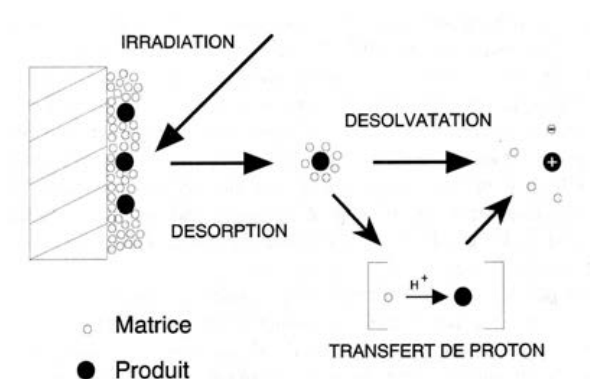


Figure 49. Principe de l'ionisation MALDI (De Hoffman et al., 1999)

Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol : TOF-SIMS

La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol (TOF-SIMS) (Thomson, 1910 (Honig, 1985) est quant à elle, une méthode d'analyse élémentaire et moléculaire à très haute sensibilité des surfaces (< 0.5 nm). Une source pulsée d'ions primaires de grande énergie cinétique (quelques KeV), bombarde la première couche atomique de l'échantillon, induisant la désorption d'ions secondaires (les ions de l'analyte). Ces derniers sont focalisés et accélérés afin d'atteindre l'analyseur à temps de vol (TOF). Cette technique permet de caractériser la composition chimique élémentaire et moléculaire de la surface de l'échantillon analysé mais également, grâce au balayage du faisceau d'ions primaires, d'obtenir une cartographie des ces éléments ou molécules à la surface de l'échantillon. Cette analyse se déroule sous ultra-vide. Les spectres de masse obtenus représentent l'intensité des ions secondaires en fonction du rapport masse/charge.

Article en préparation :

Analysis of alkaloids from Mediterranean Crambe crambe sponge by mass spectrometry imaging.

Analysis of alkaloids from Mediterranean *Crambe crambe* sponge by mass spectrometry imaging

Quentin Vanbellingen¹, Julie Croué^{2,3}, Nataly Bontemps⁴, David Touboul¹, Laurence Besseau^{2,5}, Bernard Banaigs⁴, Marcelino T. Suzuki^{2,3} and Alain Brunelle¹

¹ Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse,-91198 Gif-sur-Yvette, France

² UPMC Univ. Paris 06, USR3579, LBBM, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France,

³ CNRS, USR 3579, LBBM, F-66650, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France

⁴ CRIOBE, USR 3278 - CNRS/EPHE/UPVD, Université de Perpignan, 58 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

⁵ CNRS, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/Mer, France.

Introduction

To date, mass spectrometry imaging of marine sponges remains marginal [^{1,2}]. Furthermore, the sampling and preparation of this kind of animal tissue was not fully resolved. In this report we describe the analysis of an alkaloid extract and mass spectrometry imaging experiments performed on sections of the marine sponge *Crambe crambe*. This sponge of the order Poecilosclerida, presents in the Mediterranean Sea, is well known for the production of guanidine alkaloids like crambescins and Pentacyclic Guanidine Alkaloids (PGAs) such as crambescidins [^{3,4,5,6}]. Furthermore toxicity of *C. crambe's* attributed to its spherulous cells [⁷]. Spherulous cells are specialized cells (concentrated just beneath the sponge pinacoderm) that seem to be responsible for the storage of secondary metabolites [^{8,9}]. However to date there is no proof that crambescins and crambescidines specifically are stored into these specialized cells.

Here we aimed to determine the differences in ion composition between the three microregions: pinacoderm (accumulation of spherulous cells), choanocyte chambers and mesohyl (presence of a specific betaproteobacteria [¹⁰]) to characterized *in situ* the spatial distribution of *C. crambe's* natural products directly from the sponge section by MALDI-TOF and TOF-SIMS analysis.

Method

Biological material

Sample collection

The *C. crambe* specimens (three sponges growing in a rocky substrate) for MALDI-TOF and TOF-SIMS analysis were collected in the Bay of Banyuls-sur-Mer (Western Mediterranean Sea, France, 42° 29'454 N - 3° 08'038 E) at a depth of approximately 8 meters on 13 February 2014. Samples were placed in plastic bags underwater to avoid contact with air and immediately transported to the laboratory.

Embedding method

Four embedding media were tested to see which provided the best quality sections and whether inhibition of ionization occurred in mass spectra:

- (a) Small sponge tissue samples (5 mm³) were dipped directly into the liquid nitrogen. Frost sponge samples were embedded in OCT media in the cryostat at -20°C. Once the tissue and embedding block had frozen completely, sections were cut as described in "Cryostat method".
- (b) Small sponge tissue samples (5 mm³) were fixed overnight at 4°C in OCT medium and then dipped into absolute ethanol cooled with liquid nitrogen. The resulting sponge-OCT block were stored at -20°C (b- OCT method)
- (c) Small sponge tissue samples (5 mm³) were fixed at 4°C for 4 hours in 2,5% glutaraldehyde in phosphate buffer saline buffer (PBS), washed in the same buffer at room temperature for 15 min, embedded in OCT media (10 min) and then dipped into absolute ethanol cooled with liquid nitrogen. The resulting sponge-OCT block were stored at -20°C (c- Glutaraldehyde method)
- (d) Small sponge tissue samples (5 mm³) were placed at 4°C for 4 hours in an EtOH : Seawater solution (1 :1), washed in phosphate buffer saline at room temperature, embedded in OCT media (10 min) and dipped into absolute ethanol cooled with

liquid nitrogen. The resulting sponge-OCT block were stored at -20°C (d- Ethanol method)

Cryostat section

Samples of *C. crambe* have been cut with a cryostat (CM3050-S, Leica Microsystems SA, Nanterre, France) at -20 °C. Tissue sections of 14 µm thickness for MALDI-TOF analysis and 5 µm thickness for TOF-SIMS analysis were deposited onto ITO (Indium Tin Oxide) coated glass slides. Before analysis, tissue sections have been dried under vacuum at a pressure of few hPa during 15 minutes. The samples intended to be analyzed by the MALDI-TOF analysis were covered by a thin layer of OCT glue before cutting in order to avoid movement of the thin section.

Optical images acquisition

Optical images were recorded using an Olympus BX51 microscope equipped with ×1.25 to ×50 lenses (Olympus, Rungis, France) and a Color View I camera monitored by Cell^B software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany). For the MALDI imaging, the OpticLab H850 Histology Scanner (Plustek Technology GmbH, Ahrensburg, Germany) was used to scan the slides and define the measurement regions.

MALDI-TOF mass spectrometry imaging

Extract analysis

A matrix solution of a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) at 10 mg/mL (in acetonitrile/H₂O/trifluoroacetic acid 70/30/0.1 v:v) was mixed with the extract solution and successively diluted to obtain this followed dynamic range : 60 ng·µL⁻¹, 6 ng·µL⁻¹, 600 pg·µL⁻¹, 60 pg·µL⁻¹, and 6 pg·µL⁻¹. A volume of 0.5 µL of the solutions was put on a MALDI target according to the “dried droplet” method. The extract analysis was performed using a 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex, Les Ulis, France) equipped with a 200 Hz tripled-frequency Nd/YAG pulsed laser (355 nm) and an electrostatic mirror. The acceleration potential was fixed at 20 kV and the delayed

extraction was set at 170 ns. The laser energy was fixed at 3,500 and the spectra were obtained after an accumulation of 200 laser shots. An external calibration was applied using a commercial peptide mixture solution (Pepmix 1, LaserBio Laboratories, Sophia Antipolis, France).

Imaging of C. crambe section

A CHCA matrix solution dissolved in acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (70/30/0.1, v/v/v) at a concentration of 10 mg·mL⁻¹ was sprayed using a robotic TM-Sprayer (HTX Technologies, Carrboro, NC, USA). The nozzle temperature was fixed at 70°C and the linear velocity was set at 120 cm·min⁻¹.

MALDI imaging mass spectrometry was performed using an UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF reflectron mass spectrometer (Bruker Daltonique, Wissembourg, France) equipped with a Smartbeam-II™ Nd:YAG laser (wavelength 355 nm). The frequency of the laser was fixed at 2 kHz, and its intensity to 22 % (arbitrary units) for the samples prepared with the cryostat, 24 % for the samples prepared with OCT, 16 % for the samples prepared with ethanol, and 18 % for samples prepared with glutaraldehyde. The number of shots per pixel was set to a value of 1,000 and the distance between two adjacent pixels was fixed to 40 µm. The ions were accelerated with a potential of 25 kV and a delayed extraction time to 110 ns. The mass resolution ($M/\Delta M$, FWHM) was measured to 26,000 for a peptide ion peak at m/z 757.4 deposited outside of the sample section for external mass calibration. This external mass calibration was achieved using a commercial peptide mixture solution (Pepmix 5, LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France), and the “Cubic Enhanced” mass calibration algorithm has been selected. The normalized ion density maps were reconstructed using FlexImaging v4.0 (Bruker Daltonique, Wissembourg, France). Data was normalized according to the median normalization as was recommended by Deininger *et al.* (2011) to avoid artifacts [11].

TOF-SIMS mass spectrometry imaging

Experiments were performed using a commercial TOF-SIMS IV mass spectrometer (ION-TOF GmbH, Münster, Germany) The primary ion source was a bismuth liquid metal ion

gun. Bi_3^+ cluster ions were selected. Primary ions reached the analyzed surface with a kinetic energy of 25 keV and an angle of incidence of 45° . Secondary ions were accelerated at a kinetic energy of 2 keV, toward a field free region and a single-stage reflectron (first-order compensation). Secondary ions were post-accelerated to a kinetic energy of 10 keV before hitting the detector composed of a microchannel plate, a scintillator and a photomultiplier. Between two primary ion pulses, a low energy electron flood gun was used to neutralize the sample surface. Pulsed primary ion currents were measured thanks to a Faraday cup located on the grounded sample holder. Due to a low initial kinetic energy distribution of the secondary ions, the relationship between their time-of-flight and the root square of m/z ratio is always linear. Consequently, the mass calibration was always internal, using H^+ , H_2^+ , H_3^+ , C^+ , CH^+ , CH_2^+ and C_2H_5^+ for the positive ion mode and those C^- , CH^- , CH_2^- , C_2^- , C_3^- and C_4H^- for the negative ion mode. TOF-SIMS mass spectra and ion images were recorded using SurfaceLab 6.4 software (ION-TOF GmbH, Münster, Germany), and mass spectra were further processed with OriginPro 7.5 SR6 software (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Extract analysis

A volume of 0.5 μL of the 6 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ extract solution was deposited on a gold surface. Acquisitions were set in the so-called “high current bunched” mode. All the spectra were acquired with a primary ion dose also called “fluence” of $1 \times 10^{11} \text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Imaging of the C. crambe section

Images were acquired with a field of view of $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$. The acquisition mode is the so-called “beam scan” where the sample is motionless. In this acquisition mode, the acquisition is insured by the rastering the primary ion beam. The number of pixel was chosen as 256×256 in order to obtain a pixel size of approximately $2 \mu\text{m}$. The number of scans was fixed in order to reach a primary ion density of $5.0 \times 10^{11} \text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Results

Extract analysis

In this study, only the positive ion mode enables the ionization of alkaloids, because these compounds are naturally positively charged. Figure 1 shows the MALDI-TOF spectra of the methanolic extract of *C. crambe*. The crambescins, the crambescidins and the ptilomycaline have been easily detected.

Table 1 summarizes the results, with the mass-to-charge ratio of each detected compound with the standard deviations in ppm.

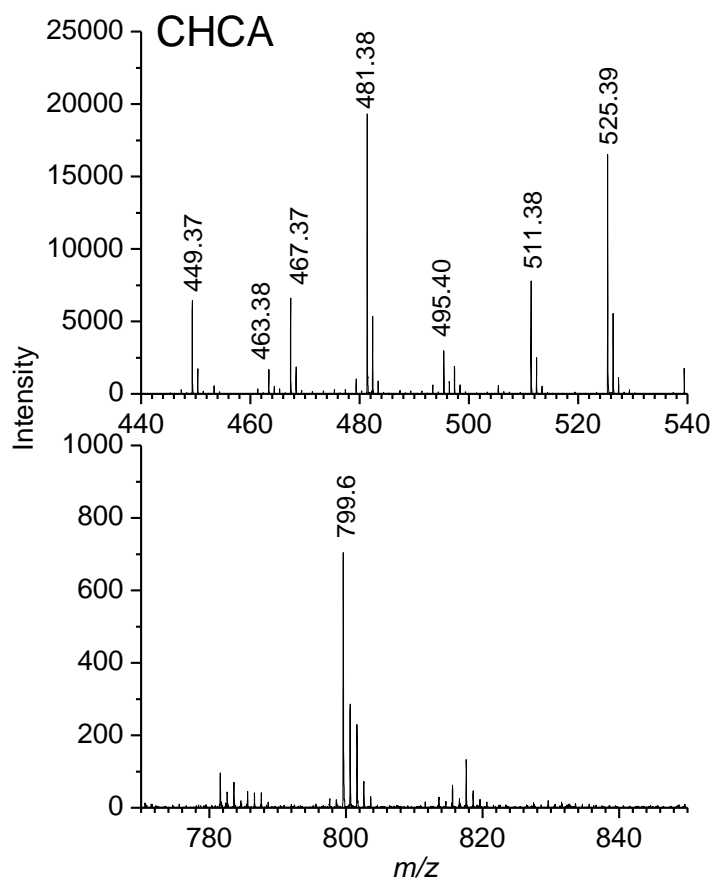


Figure 1: MALDI-TOF mass spectra of the *C. crambe* extract, analyzed with CHCA matrix.

Compound	Calculated m/z	Measured m/z	Standard deviation (ppm)
Crambescin A2 (m=2 ; n=8)	449.3599	449.3673	16.5
Didehydrocrambescin	461.3599	461.3603	0.9
Crambescin A1 / Crambescin A2 (m=2 ; n=9)	463.3755	463.3766	2.4
Crambescin B1 (m=4 ; n=6) / Crambescin C1 (m=4 ; n=6)	467.3704	467.3711	1.5
Crambescin A2 (m=2 ; n=10)	477.3912	477.3935	4.8
Crambescin B1 (m=5 ; n=6) / Crambescin C1 (m=5 ; n=6)	481.3861	481.3828	-6.9
Crambescin B1 (m=6 ; n=6) / Crambescin C1 (m=6 ; n=6)	495.4017	495.4033	3.2
Ptilomycaline	783.6101	783.5885	-27.6
Crambescidin 800	801.6212	801.6008	-25.4

Table 1: Calculated and measured mass to charge ratio (m/z) for each detected ions and standard deviation (ppm) from de MALDI-TOF analysis

For this extract, MS/MS analyses were carried out and compared with a previous ESI-MS/MS study. In our study, fragments at m/z 336 and 241 from the crambescin A2 (m=2, n=8) and fragments at m/z 284 and 174 from the crambescin C1 (m=5, n=6) were detected as in the literature. In addition, we detect other fragments at m/z 269 and 114 for the crambescin A2 (m=2, n=8), and at m/z 301 and 422 in the case of the crambescin C1 (m=5, n=6). Figure 2 shows the proposed scheme of fragmentation for crambescin A2 (m=2, n=8) and crambescin C1 (m=6, n=6).

Table 2 summarizes the major ion peaks that have been detected during the MS/MS experiment. In the case of crambescin isomers B1 and C1, the detected fragment ions suggest it to be primarily crambescin C1. Indeed primary alcohols favor a cleavage between the carbonyl and the oxygen from the ester function. In the absence of primary alcohol, the cleavage preferentially occurs between the oxygen and the alkyl group (data not shown).

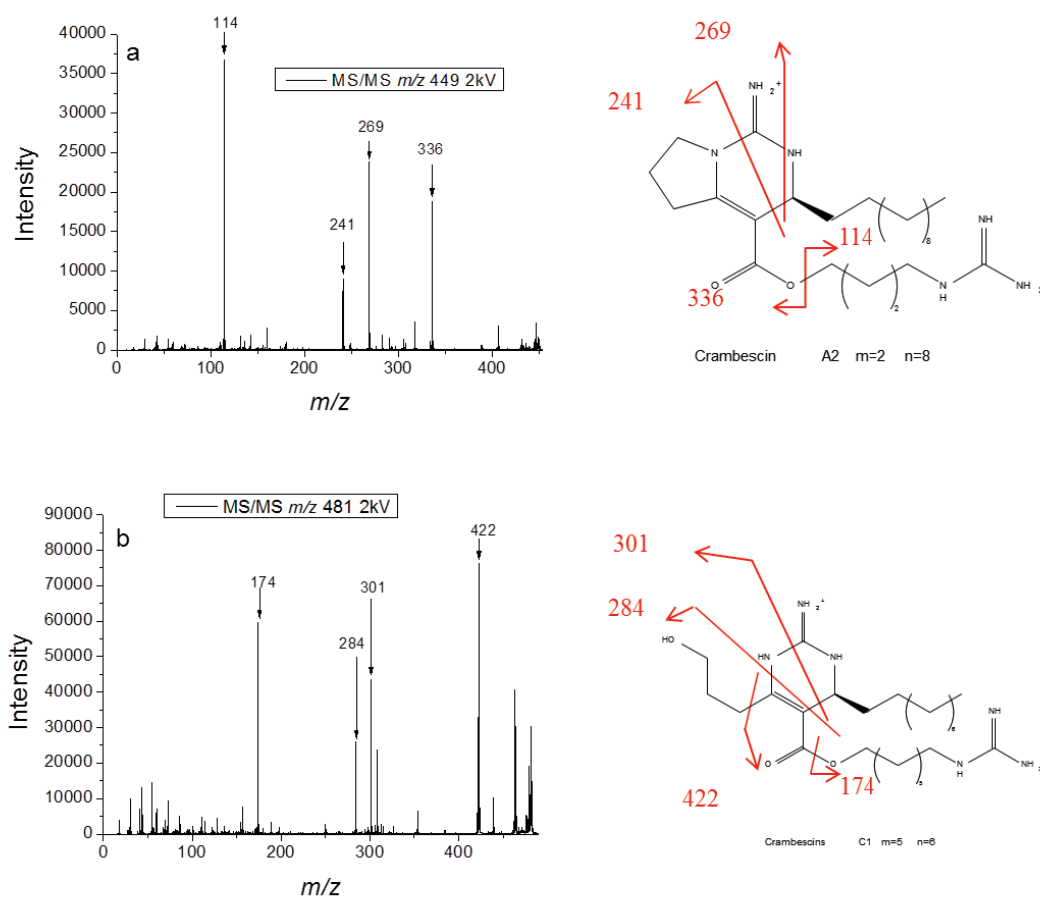


Figure 2: MALDI-MS/MS spectra of selected ions (a) crambescin A2 ($m=2$; $n=8$) (b) crambescin C1 ($m=6$; $n=6$)

Compounds	m/z of the fragment ions
Crambescin A2 ($m=2$; $n=8$)	241; 269; 336; 114
Didehydrocrambescin	156; 283; 306
Crambescin A1 / Crambescin A2 ($m=2$; $n=9$)	283
Crambescin B1 ($m=4$; $n=6$) / Crambescin C1 ($m=4$; $n=6$)	160; 270; 287; 408; 425
Crambescin A2 ($m=2$; $n=10$)	114; 241; 269; 363
Crambescin B1 ($m=5$; $n=6$) / Crambescin C1 ($m=5$; $n=6$)	174; 284; 301; 422
Crambescin B1 ($m=6$; $n=6$) / Crambescin C1 ($m=6$; $n=6$)	188; 298; 315; 436
Ptilomycaline	360; 380; 384; 402; 694
Crambescidin 800	162; 188; 384; 398; 402
Crambescidin 816	162; 384; 402
Crambescidin 830	Not enough ion signal for the MS/MS

Table 2: Fragment ions detected in MALDI-MS/MS

TOF-SIMS mass spectra of *C. crambe* extract are shown in Figure 3. In the low mass range, fragments at m/z 284.21, 336.26 and 384.25 could be attributed to crambescin C1, crambescin A2 and crambescidins, respectively. The identified fragments are summarized in Table 3.

Ion peaks at m/z 511.36, 525.38, and 539.38 have been detected but could not be attributed.

Due to the non-homogeneity of the “Dry Droplets”, we could not determine the limit of detection.

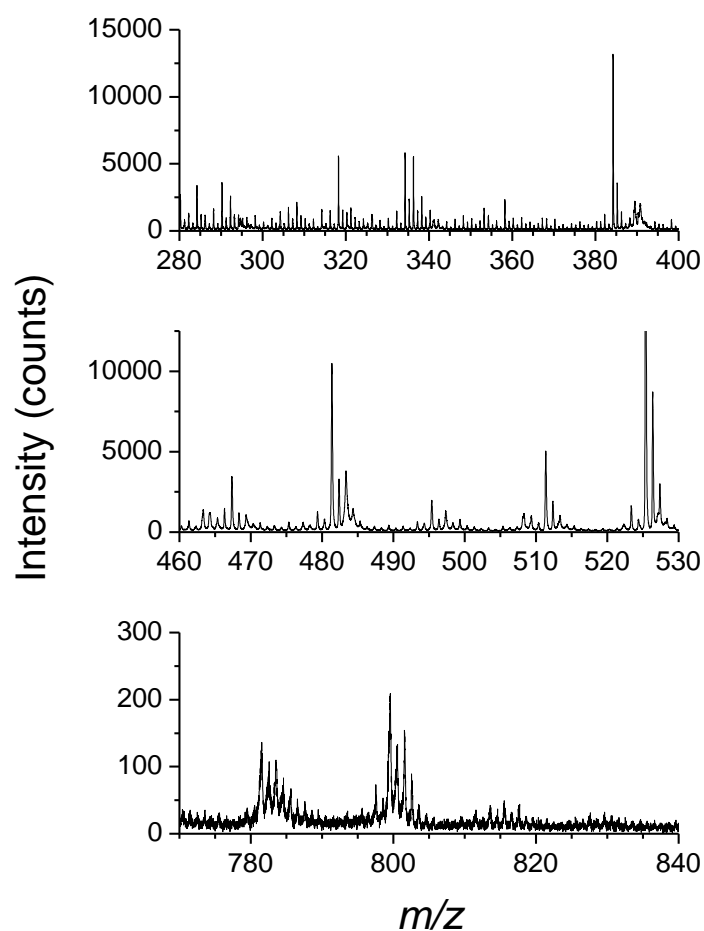


Figure 3: TOF-SIMS spectra of the *C. crambe* extract

Compound	Calculated m/z	Measured m/z	Standard deviation (ppm)
Crambescin A2 (m=2; n=8)	449.3599	449.3606	1.56
Didehydrocrambescin	461.3599	461.3575	-5.2
Crambescin A1 / Crambescin A2 (m=2; n=9)	463.3755	463.376	1.08
Crambescin B1 (m=4 ; n=6) / Crambescin C1 (m=4; n=6)	467.3704	467.3772	-5.99
Crambescin A2 (m=2; n=10)	477.3912	NA	NA
Crambescin B1 (m=5; n=6) / Crambescin C1 (m=5; n=6)	481.3861	481.3854	-1.45
Crambescin B1 (m=6; n=6) / Crambescin C1 (m=6; n=6)	495.4017	495.3944	-14.74
Ptilomycaline	783.6101	783.541	-88.18
Crambescidin 800	801.6212	801.5784	-53.4
Crambescidin 816	817.6161	817.5988	21.15
Crambescidin 830	831.6318	NA	NA
Fragment de crambescin C1 (m=5; n=6)	284.1974	284.2073	34.83
Fragment de crambescin A2 (m=2; n=8)	336.2651	336.258	-14.86
Fragment de crambescidin	384.2287	384.2463	45.81

Table 3: Calculated and measured mass to charge ratio (m/z) for the detected ions and standard deviation (ppm), from the TOF-SIMS analysis of the extract.

Mass Spectrometry Imaging

Sponges are complex and structured organisms. The presence of spicules (sponge skeleton) makes difficult to obtain flat and non-ripped tissue sections. Therefore, four different embedding methods have been tested. Figure 4 shows the micrographs of the sections obtained with each of the four methods. The tissue is shows more evidence of rupture using method a, than with the embedding methods, mostly likely due to the movement of the spicules during the cutting process.

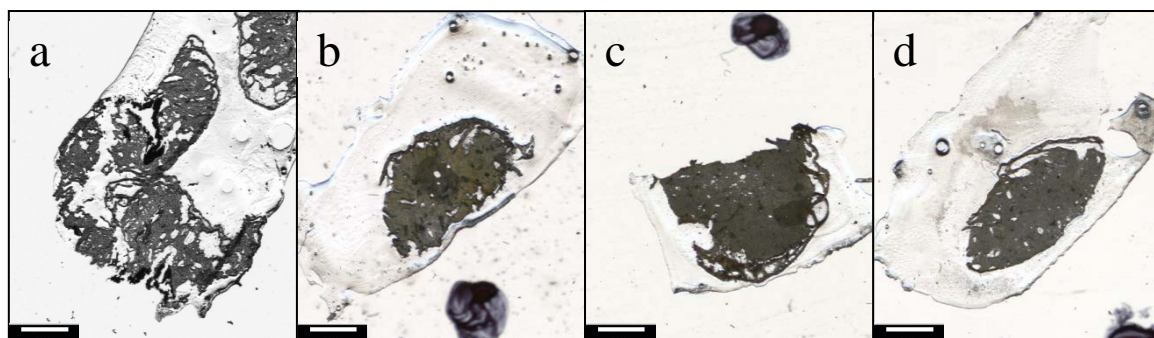


Figure 4: Images of the analysed samples for different preparation methods. (a) Cryostat method (b) OCT method (c) Glutaraldehyde method (d) Ethanol method. Scale bar : 1000 μm .

Figure 5 shows the normalized mass spectra from the entire image (see above).

Regarding the relative intensities, the glutaraldehyde preparation allows a significant increase of the ion signals from crambescidin family, but the crambescidin ion peaks are removed. The ethanol method generates less intense ion peaks. The acquisitions from cryostat method and OCT method generate the mass spectra with the highest relative intensities for both alkaloids families.

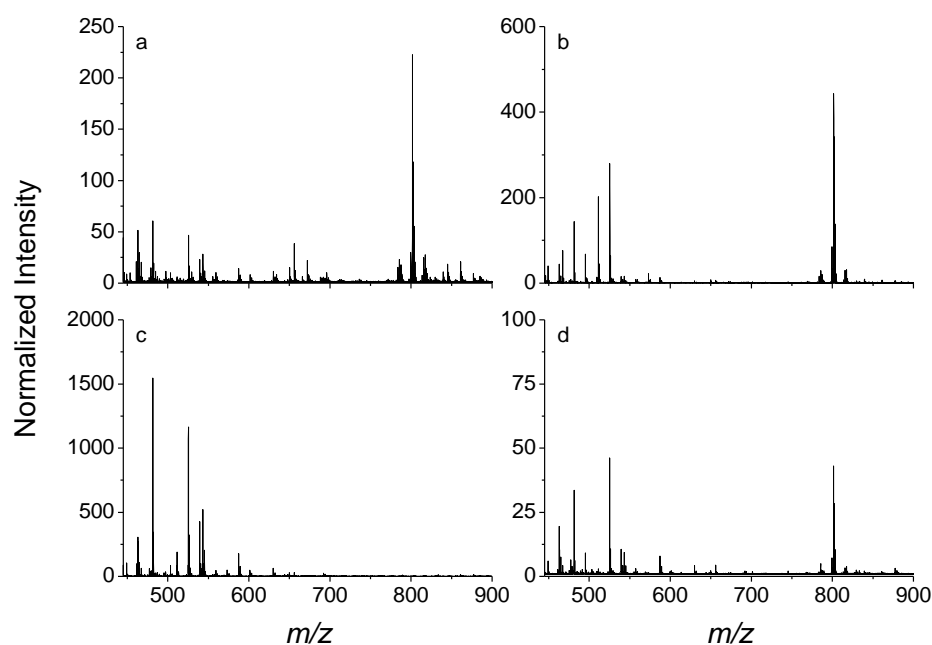


Figure 5: MALDI mass spectra of the overall average images of the different preparation methods (a) cryostat method (b) OCT preparation (c) glutaraldehyde preparation (d) Ethanol preparation

Figure 6 shows MALDI ion images of several ion detected at the surface of the samples, and with the different sample preparation methods already described above. For each image, the most intense ion peak, representative of the alkaloids, was chosen. The displayed ion images are those of the protonated Crambescin C1 ($m=5$; $n=6$) at m/z 481.42 (Figure 6a-d), and of the protonated Crambescidin 800 at m/z 801.65 (Figure 6e-h). In all these ion images, metabolites appear as if they were delocalized or not detected, this delocalization perhaps an effect of the ethanol or glutaraldehyde treatments. However, since this was the case even in method a) where no ethanol/glutaraldehyde was used, a possibility would be that the OCT media used for to cover the tissue, delocalization of compounds when it reached its melting point during the vacuum defrosting step.

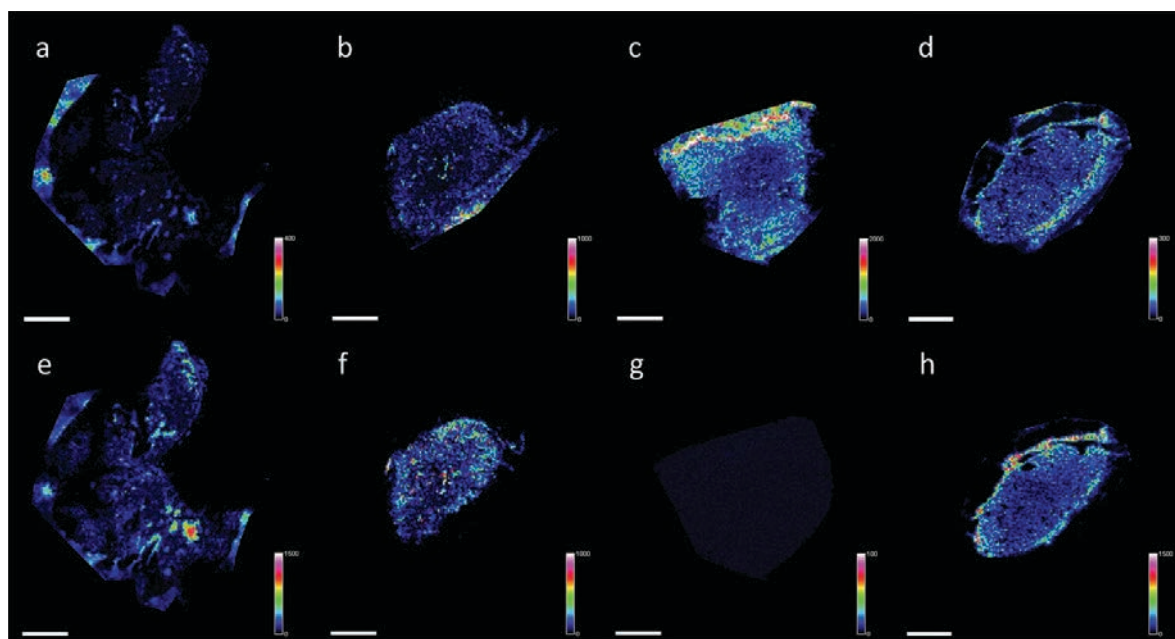


Figure 6: MALDI mass spectrometry ion images of the following ions, acquired with different sample preparation methods: (a) Crambescin C1 ($m=5$, $n=6$) cryostat method (b) Crambescin C1 ($m=5$, $n=6$) OCT method (c) Crambescin C1 ($m=5$, $n=6$) glutaraldehyde method (d) Crambescin C1 ($m=5$, $n=6$) ethanol method (e) Crambescidin 800 cryostat method (f) Crambescidin 800 OCT method (g) Crambescidin 800 glutaraldehyde method (h) Crambescidin 800 ethanol method. Scale bar : 1000 μm .

In contrast to the MALDI-imaging experiments, sample preparation for the TOF-SIMS sponge sections were cut without OCT. A picture of the analyzed area is shown in Figure 7 (cryostat method). This area includes choanoderm chambers, mesohyl and spicules.

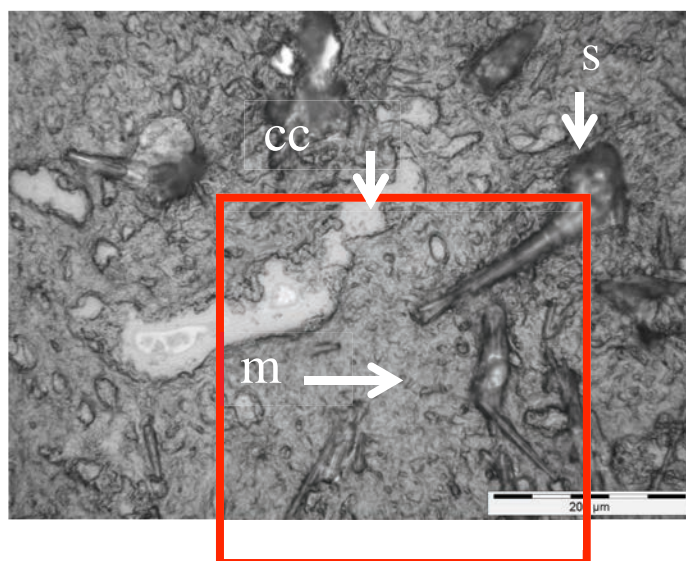


Figure 7: Microscope image of a *C. crambe* section. The red square of 400 μm side indicates the analysed surface. cc= choanoderm chambers, m = mesohyl, s = spicule. (cryostat method)

Mass spectra from the analyzed area (Figure 8) show that the ions from crambescins are detected. Mass assignments and standard deviation in ppm are shown in Table 4. In the spectrum of the image, ion peaks detected at $m/z \sim 678.6$ have not been attributed. We can suppose that these peaks are sponge lipids, since a constant mass difference of 14 Da suggests that this distribution could originate from the fragmentation of an aliphatic chain. Furthermore, the ion density maps of these peaks are similar to those of the fatty acid ion density maps (data not show).

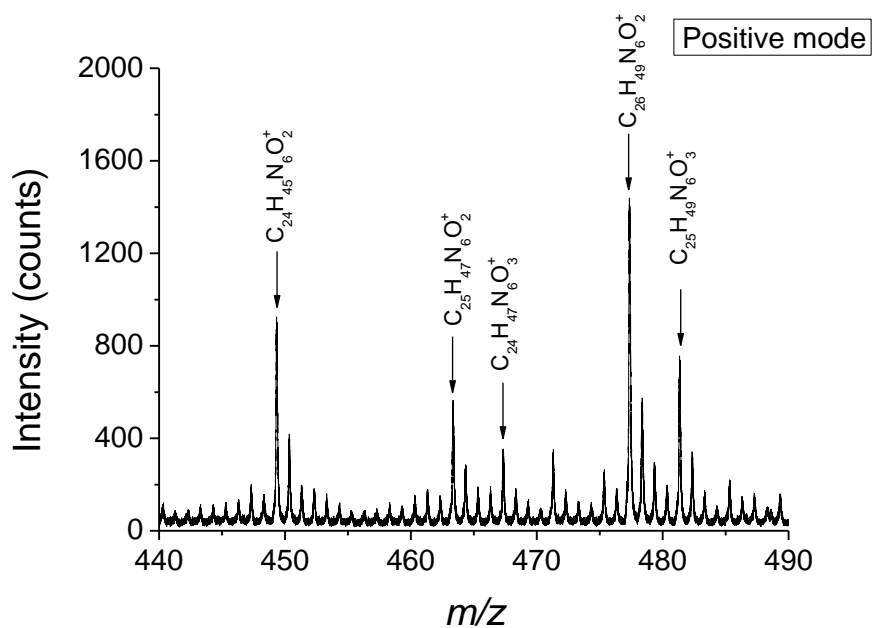


Figure 8: Positive TOF-SIMS spectrum of the images.

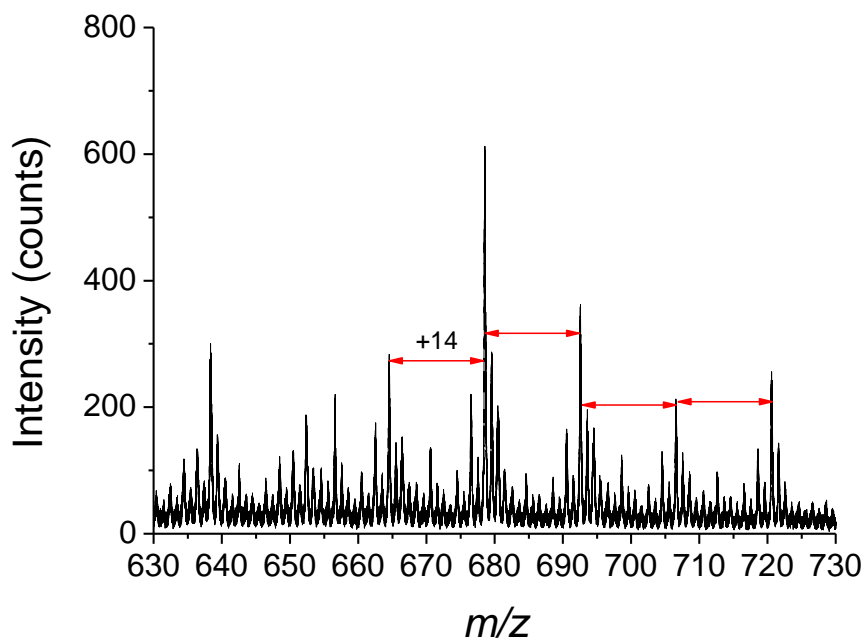


Figure 9: Positive TOF-SIMS spectrum showing intense unassigned ion peaks.

Name	Formula	Calculated m/z	Measured m/z	Standard deviation (ppm)
Crambescin A2 (m=2; n=8)	$C_{24}H_{45}N_6O_2^+$	449.36	449.35	-12.7
Crambescin A1 / A2 (m=2; n=9)	$C_{25}H_{47}N_6O_2^+$	463.38	463.37	-19.4
Crambescin B1 / C1 (m=4; n=6)	$C_{24}H_{47}N_6O_3^+$	467.37	467.35	-43.0
Crambescin A2 (m=2; n=10)	$C_{26}H_{49}N_6O_2^+$	477.39	477.39	-10.3
Crambescin B1 / C1 (m=5; n=6)	$C_{25}H_{49}N_6O_3^+$	481.39	481.37	-34.5

Table 4: Calculated and measured mass to charge ratio (m/z) for each detected ion and calculated standard deviation (ppm) from the positive TOF-SIMS imaging of *C. crambe* section.

The analysis in negative ion mode allows the detection of fatty acid ions and silica ions, of which identification and standard deviation in ppm are displayed in Table 5 (spectra not shown). However, intense ion peaks are detected in negative ion mode as shown in Figure 10, which could be also lipids from the sponge, as explained above.

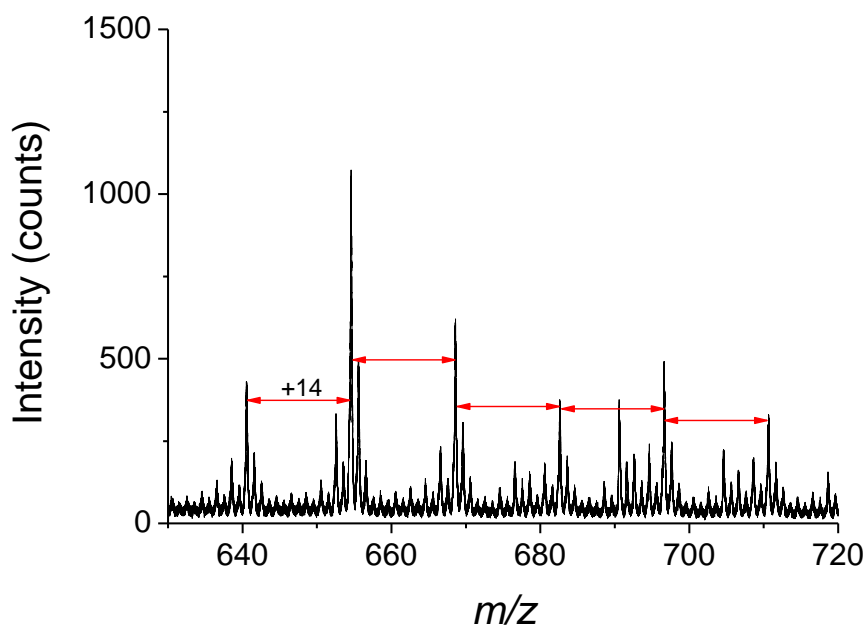


Figure 10: Negative TOF-SIMS spectrum showing intense unassigned ion peaks.

Name	formula	Calculated <i>m/z</i>	Measured <i>m/z</i>	Standard deviation (ppm)
[C14:0-H] ⁻	C ₁₄ H ₂₇ O ₂ ⁻	227.2011	227.1934	-33.9083
[C16:1-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₉ O ₂ ⁻	253.2168	253.2205	14.7897
[C16:0-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₁ O ₂ ⁻	255.2324	255.2289	-13.7326
[C18:1-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁻	281.2481	281.2429	-18.3290
[C18:0-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₅ O ₂ ⁻	283.2637	283.2503	-47.3234

Table 5: Calculated and measured mass to charge ratio (*m/z*) for each detected ion and calculated standard deviation (ppm) from the negative TOF-SIMS imaging of *C. crambe* section.

The TOF-SIMS images corresponding to the crambescins, the fatty acids and the silica (SiHO₂⁻ and SiO₃⁻) are displayed in Figure 11, together with a three-color overlay of these images (Figure 11d). These images show that the alkaloids do not have the same distribution as the fatty acids. Indeed, the alkaloids are present in the mesohyl with some punctuality, and thus suggesting a possible implication of bacteria in their biosynthesis. On the other hand, ion peaks characteristic of the crambescidins were not detected. That is why the implication of bacteria in the biosynthesis of PGAs could not be investigated with this setting.

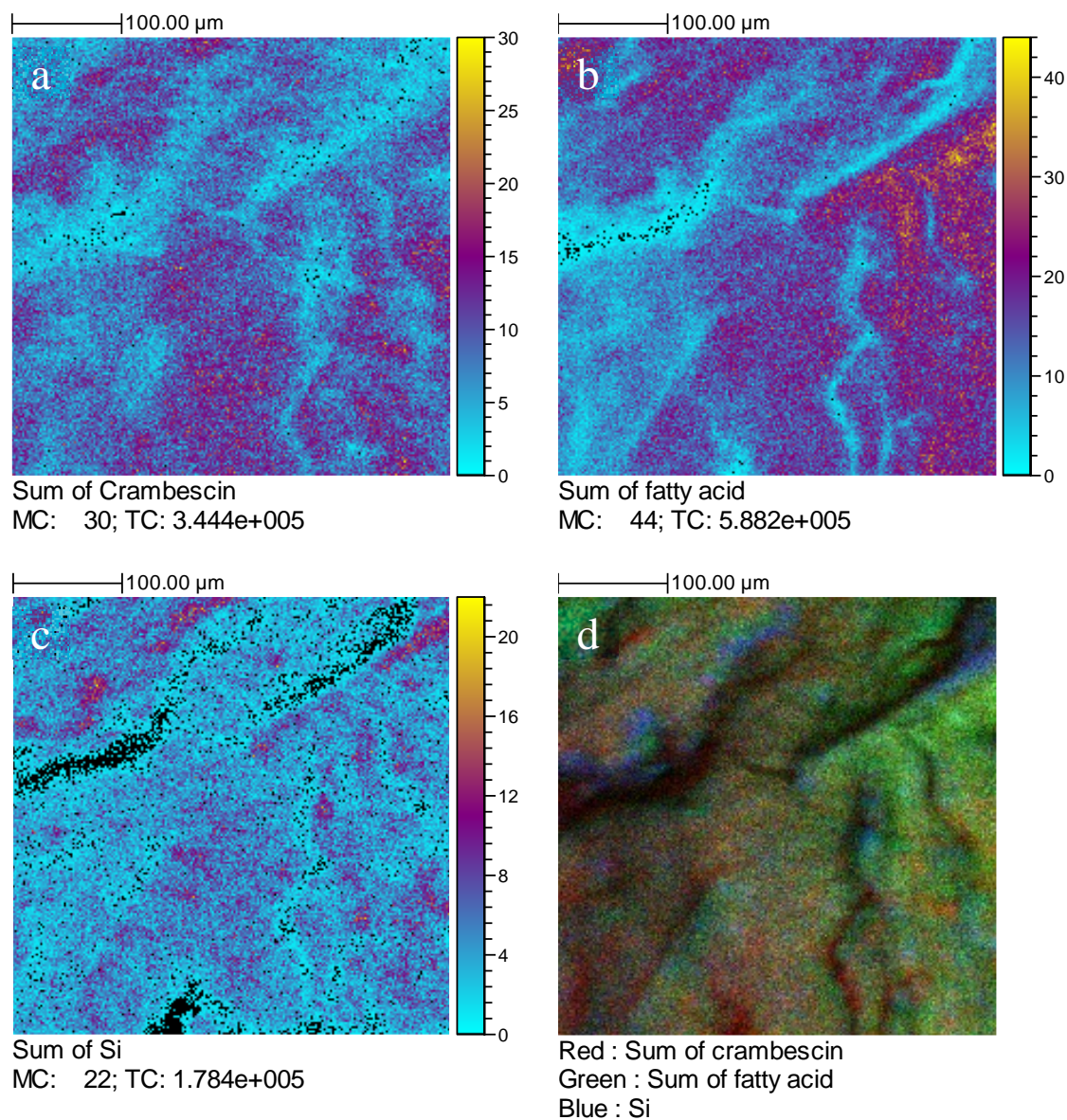


Figure 11: TOF-SIMS ion image of *C. crambe* section. (a) sum of crambescin ions (b) sum of fatty acid ions (c) sum of silica ions (d) three colors overlay of the crambescins in red, the fatty acids in green and the silica ions(SiHO_2^- and SiO_3^-) in blue. The maximum number of counts mc corresponds to the amplitude of the colour scale: $[0, mc]$, and tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (it is the sum of counts in all the pixels). Field of view $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$. Number of pixels 256×256 .

Conclusion

The analysis of methanolic extracts from *Crambe crambe* by MALDI-TOF and TOF-SIMS shows that MALDI-TOF is a more sensitive desorption/ionization technique for guanidinium alkaloids of the crambescine and crambescidine families, with a large number of detected and assigned ion species. The comparison between measured and exact mass also allowed the identification of different specific alkaloids. Furthermore, MS/MS analysis aided the identification of the ions, and the discrimination between two isobars (the Crambescin B1 and C1). MALDI-TOF is the most sensitive method for the detection of crambescidins (PGAs alkaloids). On the other hand TOF-SIMS-imaging allowed the identifying alkaloids, fatty acids and silica. The identification of peaks which could be attributed to lipids could be subject of more in depth analysis.

With these new technological advances it was possible to analyze small structures with a high spatial definition and high mass resolution. However, the sample preparation needs to be improved in order to avoid tearing and to flatten sponge sections. Also, it is clear that the sample preparation methods for MALDI-imaging will need to be improved to avoid the delocalization of metabolites. For the future assays, analyses could be made for example at lower temperatures to avoid the probable delocalization due to vacuum defrosting.

References

- [1] Eduardo Esquenazi, Cameron Coates, Luke Simmons, David Gonzalez, William H. Gerwick and Pieter C. Dorrestein "Visualizing the spatial distribution of secondary metabolites produced by marine cyanobacteria and sponges via MALDI-TOF imaging" *Molecular Biosystems* 4, 462-570 (2008)
- [2] Jennifer E. Yarnold, Brett R. Hamilton, David T. Welsh, Gertruida F. Pool, Deon J. Venter and Anthony R. Carroll "High resolution spatial mapping of brominated pyrrole-2-aminoimidazole alkaloids distributions in the marine sponge *Stylissa flabellata* via MALDI-mass spectrometry imaging" *Molecular Biosystems* 8, 2249-2259 (2012)
- [3] R.G.S. Berlinck, J.C. Braekman, D. Daloze, I. Bruno, R. Riccio, D. Rogeau and P. Amade "Crambines c1 and c2: two further ichthyotoxic guanidine alkaloids from the sponge *Crambe crambe*" *Journal of Natural Products* 55, 528-532 (1992)
- [4] R.G.S. Berlinck, J.C. Braekman, D. Daloze, I. Bruno, R. Riccio, S. Ferri, S. Spampinato and E. Speroni "Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816" *Journal of Natural Products* 56, 1007-1015 (1993)
- [5] E. Palagiano, S. De Marino, L. Minale, R. Riccio, F. Zollo, M. Iorizzi, J. B. Carré, C. Debitus, L. Lucarain and J. Provost "Ptilomycalin A, Crambescidin 800 and Related New Highly Cytotoxic Guanidine Alkaloids from the Starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffernani*" *Tetrahedron* 51, 3675-3682 (1995)
- [6] S. Bondu, G. Genta-Jouve, M. Leiròs, C. Vale, J.-M. Guigonis, L. M. Botana & O. P. Thomas "Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*" *RSC Advances* 2, 2828-2835 (2012)
- [7] M. J. Uriz, M. A. Becerro, J. M. Tur & X. Turon. Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Mar Biol* 124, 583-590 (1996).
- [8] H. Bretting & K. Königsman. Investigations on the lectin-producing cells in the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). *Cell Tissue Res* 201, 487-497 (1979).
- [9] J. E. Thompson, K. D. Barrow & D. J. Faulkner. Localization of two brominated metabolites, aerothionin and homoaerothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (5 *Verongia thiona*). *Acta Zool* 64, 199-210 (1983).
- [10] J. Croué, N. J. West, M. -L. Escande, L. Intertaglia, P. Lebaron, & M. T. Suzuki. A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*. *Scientific Reports*, 3 (2013)
- [11] S. -O. Deininger, D. S. Cornett, R. Paape, M. Becker, C. Pineau, S. Rauser, A. Walch, & E. Wolski. "Normalisation in MALDI-TOF imaging datasets of proteins: practical considerations" *Anal Bioanal Chem* 401, 167-181 (2011)

Conclusion générale Chapitre 4

Les études réalisées dans ce Chapitre 4 avaient pour objectifs d'apporter des hypothèses quant à la possible implication des micro-organismes associés à *C. crambe* dans la synthèse des alcaloïdes pentacycliques guanidiniques extraits de cette dernière. La comparaison des empreintes chimiques des micro-organismes minoritairement associés à *C. crambe* isolés durant l'étude de diversité microbienne cultivable (Chapitre 3), a montré, que ces micro-organismes spécifiques n'étaient pas, à eux seuls, producteurs des PGAs. Afin d'évaluer le potentiel rôle de la bêtaprotéobactérie spécifique majoritaire, deux études ont été réalisées. La culture *ex situ* accompagnée d'un stress pH ainsi que l'imagerie par spectrométrie de masse, n'ont à ce jour, pas permis de progresser scientifiquement sur cette question précise. Néanmoins, ces expériences se sont révélées prometteuses et nécessitent d'être poursuivies. En effet, un composé apparenté à une Crambescine A semble être affecté par la culture *ex situ* additionnée d'un stress pH drastique (pH 6.0). Cet alcaloïde a été isolé et caractérisé lors de cette thèse pour la première fois : il s'agit une crambescine A ayant une chaîne à 15 atomes de carbone comportant 4 insaturations. Ceci semble important car la présence de ce résidu d'acide gras polyinsaturé est à prendre en compte dans la réflexion autour de la biosynthèse des crambescines. Il serait donc judicieux d'analyser l'effet de la culture *ex situ* accompagnée d'un stress pH sur la composition de la communauté microbienne afin d'établir une corrélation entre la présence de ce composé (et des autres dérivés insaturés) et les micro-organismes associés à *C. crambe*. Ces études étaient initialement prévues au cours de cette thèse cependant, la mise en place de l'expérience de stress ainsi que l'isolement et la caractérisation du composé insaturé de

type crambescine A ont été des étapes nécessaires avant de poursuivre. Des travaux ultérieurs pourront être réalisés à partir de ce travail préliminaire. En ce qui concerne la localisation des alcaloïdes au sein de l'éponge, l'étude de faisabilité a montré qu'ils sont facilement visualisables par imagerie en spectrométrie de masse. Le MALDI-TOF permet en particulier de voir spécifiquement les deux sous-familles avec des sensibilités qui ont permis de commencer les premières expériences *in situ*. La difficulté principale à surmonter reste la préparation des échantillons, tant au niveau des techniques de coupes que d'inclusion, afin d'éviter la délocalisation des métabolites par entraînement mécanique ou diffusion. L'exploitation des résultats reste à terminer et de nouveaux essais de préparation des coupes seront réalisés afin de réussir à visualiser la distribution spatiale spécifique *in situ* des crambescines et crambescidines.

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives

Sur la base des résultats majeurs obtenus au cours de ce travail, ce chapitre vise à proposer des perspectives afin de poursuivre notre recherche sur la compréhension du possible rôle des micro-organismes dans la synthèse des métabolites dits secondaires isolés des éponges, notamment de *Crambe crambe*.

Ce travail comportait deux objectifs principaux (i) caractériser la communauté microbienne associée à *C. crambe* et, (ii) étudier les liens, s'ils existent, entre les micro-organismes symbiotiques de cette éponge et les alcaloïdes présents dans ses extraits.

C. crambe (Schmidt, 1862) est une éponge encroûtante rouge-orangée largement retrouvée en Méditerranée. Elle est connue pour la très forte toxicité de ses extraits (Uriz et al., 1996) mais également car elle est une source d'alcaloïdes guanidiniques (Crambescines et Crambescidines) (Berlinck et al., 1990 , 1992 , 1993 ; Jares-Erijman et al., 1993 ; Bondu et al., 2012) possédant un large spectre d'activités biologiques. Comme pour de nombreux métabolites d'origine marine, les voies de biosynthèse de ces composés n'ont pas encore été élucidées. Cependant plusieurs auteurs suggèrent que les alcaloïdes guanidiniques pentacycliques de type Crambescidines présenteraient une structure dérivant de polycétides (Snider et Shi, 1993 ; Berlinck et al., 2008 ; Makarieva et al., 2012). Les polycétides sont une famille de produits naturels biosynthétisés par un important complexe enzymatique multifonctionnel presque exclusivement identifié chez les bactéries (Bode et Müller, 2005) et appelé polycétides-synthase (PKS). De plus, ces alcaloïdes guanidiniques pentacycliques ont été isolés des tissus d'espèces d'éponges distinctes provenant de zones géographiques différentes appartenant à plusieurs genres de l'ordre des Poecilosclerida: *Monanchora* sp. (Tavares et al., 1994 ; Bensemhoun et al., 2007 ; Gallimore et al., 2005), *Batzella* sp. (Patil et al., 1995 –

1997), *Hemimyscale* sp. (Kashman et al., 1989 ; Ohtani et al., 1992) ainsi qu'à partir de *Ptilocaulis* sp. appartenant à l'ordre des Halichondrida. Une structure de type polycétidique et des sources aussi distinctes pouvaient laisser supposer l'implication de micro-organismes dans la synthèse de ces composés. Cependant, les rares études visant à étudier les micro-organismes associés à cette éponge (majoritairement par l'utilisation d'outils microscopiques) étaient contradictoires (Becerro et al., 1994 ; Uriz et al., 1996 ; Sarà, 1965). Ainsi, le premier objectif de ce travail a été de caractériser la communauté microbienne associée à *C. crambe* afin d'apporter des éléments nouveaux permettant de répondre à cette controverse.

(i) L'utilisation de techniques à la fois moléculaires et microscopiques (pyroséquencage-454 de l'ARNr16S total ; CARD-FISH et MET) ont permis de caractériser la communauté microbienne associée à cette éponge méditerranéenne et d'apporter l'évidence d'une association entre *C. crambe* et une bêtaprotéobactérie spécifique. En effet, les données obtenues par pyroséquencage-454 de l'ARNr16S total ont révélé que la communauté bactérienne associée à cette éponge présentait une faible diversité, dominée par une seule OTU (regroupant près de 74% de l'ensemble des séquences obtenues) de bêtaprotéobactérie n'étant phylogénétiquement proche (>90%) d'aucune bactérie décrite dans la littérature. La présence *in situ* de cette bactérie au sein des tissus de *C. crambe* a été démontrée par hybridation *in situ* par fluorescence (CARD-FISH). L'utilisation de la sonde EUB338-I (spécifique du domaine des bactéries) a confirmé la présence de bactéries dans le mésohyle de l'éponge. Quant à l'utilisation de la sonde spécifique identifiant la bêtaprotéobactérie majoritaire (sonde BET467), elle a confirmé la structure générale de la diversité bactérienne associée à *C. crambe*,

composée majoritairement de cette dernière. De plus, l'observation en microscopie électronique à transmission de sections de tissus de *C. crambe*, a confirmé la présence d'un seul morphotype bactérien localisé de façon diffuse au sein du mésohyle. L'ensemble de ces informations confirme la classification des éponges du genre *Crambe* sp. au sein des éponges « LMA » établie par Vacelet et Donadey (1977). L'analyse dans la littérature de l'ensemble des séquences ARNr 16S disponibles extraites d'éponges a montré la dominance des phyla Proteobacteria (Classes alpha-, bêta-, et gamma-), Chloroflexi, Actinobacteria et Acidobacteria (Taylor et al., 2007 ; Webster et al., 2010 ; Webster et Taylor, 2012). De plus, l'étude du Tableau 2 (Chapitre 1 Etat de l'Art) regroupant les données disponibles sur les micro-organismes associés aux éponges « LMA » montre que les communautés microbiennes associées à ces dernières sont majoritairement dominées par différentes protéobactéries. Ainsi, la dominance de la communauté microbienne associée à *C. crambe* par une bêta-protéobactérie confirme les données précédentes de la littérature.

La présence de micro-organismes au sein des tissus de cette éponge soulève la question de leurs possibles implications dans la biosynthèse des métabolites bioactifs isolés de *C. crambe*.

(ii) Le deuxième objectif de ce travail a donc été de chercher si il existait un lien entre les micro-organismes symbiotiques de *C. crambe* et les alcaloïdes extraits de cette éponge. Selon la littérature, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour déterminer si la biosynthèse de produits naturels bioactifs peut être attribuée à l'éponge ou à ses micro-organismes symbiotiques. La méthode la plus directe est la culture des micro-organismes producteurs des métabolites (Hill, 2004). De ce fait, nous avons mis en place

différentes techniques de culture afin d'isoler les bactéries retrouvées au sein des tissus de *C. crambe*, et plus particulièrement la bêtaprotéobactérie majoritaire associée à cette éponge (Croué et al., 2013). L'utilisation d'une procédure d'acclimatation (inspirée de Hahn et al., 2003) mais également de divers milieux de culture mimant des conditions proches de celles qui sont retrouvées au sein du mésohyle, ou présupposant un métabolisme de la bactérie (oxydation d'ammonium), ont contribué à augmenter la culturabilité de certains micro-organismes minoritaires associés à cette éponge. Cependant, l'ensemble de ces techniques de culture n'a pas permis l'isolement de la bêtaprotéobactérie associée à *C. crambe*. Ces résultats viennent compléter ceux obtenus par Oztürk et collaborateurs (2013), portant sur l'étude de la diversité bactérienne cultivable de *C. crambe* et confirment le fait que la bêtaprotéobactérie majoritaire est difficilement cultivable, celle-ci n'ayant pas été isolée malgré l'utilisation de seize milieux de culture de composition et concentration en nutriments distincts (Oztürk et al., 2013 ; Croué et al., in prép.). Ces résultats ne sont pas étonnants, et confirment qu'il est extrêmement difficile de parvenir à isoler cultiver un symbionte hors de son hôte. Il a été rapporté que moins de 14% des bactéries associées aux éponges seraient cultivables (Sipkema et al., 2011).

Bien que l'importante concentration des alcaloïdes guanidiniques présents dans les extraits de *C. crambe* n'étaient pas en faveur d'une biosynthèse par des micro-organismes minoritairement associés à celle-ci, nous avons par comparaison des empreintes chimiques des extraits des souches isolées à celles de l'éponge, conforté l'hypothèse selon laquelle ces micro-organismes n'étaient pas, à eux seuls, les producteurs des alcaloïdes guanidiniques. Cependant, afin d'appuyer ces résultats il

serait important de multiplier les milieux et conditions de culture testés. Ceci permettrait d'influencer la diversité des métabolites produits par un micro-organisme donné et augmenterait ainsi les connaissances sur la chimiodiversité imputable à celui-ci (Hill, 2004). Même si ces résultats étaient assez prévisibles, il était essentiel de ne pas écarter l'éventuel rôle de ces micro-organismes minoritaires malgré l'importante concentration tissulaire des composés. En effet, ne connaissant pas la demi-vie de ces composés, rien n'indique que les fortes concentrations retrouvées dans l'éponge soient dues à une production en grande quantité de ces derniers. Il peut être envisagé que ces composés possèdent une demi-vie importante et qu'ils soient stockés sur le long terme.

Si tel n'est pas le cas, la bêtaprotéobactérie majoritaire représente le seul micro-organisme candidat pouvant intervenir dans la synthèse des alcaloïdes pentacycliques guanidiniques extraits de cette éponge. Comme ce micro-organisme n'a pas pu être isolé nous avons décidé d'utiliser au cours de ce travail des techniques indirectes afin de tenter tout de même d'apporter des éléments de réponse à la question posée.

Tout d'abord, nous avons cherché à modifier la composition de la communauté microbienne associée à *C. crambe* et plus particulièrement la dominance de l'OTU majoritaire, en mettant en place une étude préliminaire de culture *ex situ* de colonies d'éponge en présence d'un stress abiotique (diminution du pH de l'eau environnante) afin de suivre les possibles conséquences sur l'empreinte chimique de *C. crambe*. Deux valeurs de pH ont été testées. Il semble que la diminution du pH à 7.0 n'entraînerait pas de modification majeure de l'empreinte chimique et que les variations observées soient dues principalement à une variabilité intraspécifique. Cependant, la diminution du pH à 6.0 semble, quant à elle, induire des modifications plus significatives de l'empreinte

chimique de l'espèce. En effet, on observe un effet très net du stress pH sur un des pics du chromatogramme dont la surface diminue d'au moins 95% (il s'agit d'une étude préliminaire réalisée sans triplicats, les résultats doivent donc être considérés avec précaution). Après analyse de ce pic en LC/MS, nous nous sommes aperçus que ce composé n'était pas encore décrit dans la littérature (MarinLit2012). Il nous a alors paru essentiel de purifier et de caractériser la structure de cet alcaloïde. L'analyse des données de spectrométrie de masse et de RMN nous a conduits à proposer une structure de type crambescine A (à noyau bicyclique contenant une pyrrolidine) avec une chaîne inférieure guanidynoalkyle à 5 atomes de carbone et une chaîne supérieure en 15 atomes de carbones comportant 4 insaturations. Il s'agit là du premier exemple de crambescine à chaîne guanidynoalkyle de cette longueur et à chaîne alkyle insaturée. La présence d'analogues insaturés à chaîne guanidynoalkyle à 4, 6 et 7 atomes de carbone a également été mise en évidence sur les empreintes obtenues en LC/MS. Mais, à la différence du composé isolé lors de ce travail, ils ne semblent pas être aussi nettement affectés par la diminution de pH. Il est intéressant de souligner que ceux-ci sont également présents dans certains extraits de *C. crambe* collectés à Nice, mais le composé nouveau à 5 atomes de carbone que nous avons isolé chez *C. crambe* de Banyuls-sur-Mer n'a pas été détecté à Nice (communication personnelle et article en préparation de G. Genta-Jouve et O. Thomas). Ayant observé un effet potentiel de la culture *ex situ* accompagnée d'une diminution du pH de l'eau environnante à 6.0, il serait intéressant de compléter cette étude en analysant en parallèle les modifications possibles de la communauté microbienne symbiotique. Ceci est d'autant plus intéressant que l'originalité structurale de ce composé pourrait rendre compte d'une spécificité au niveau des acides gras entrant dans sa biosynthèse, et pourrait suggérer l'influence de

micro-organismes impliqués dans leur production. En effet, si la disparition de ce composé est corrélée à une modification majeure de la communauté microbienne et plus particulièrement à une diminution de l'OTU majoritaire, ou à des changements au niveau de son transcriptome, il serait alors possible d'émettre des hypothèses quant à la participation potentielle de ce micro-organisme dans la biosynthèse de ce composé spécifique de *C. crambe* de Banyuls-sur-Mer. Ceci n'est qu'une hypothèse car il s'agit d'une symbiose et nous ne pouvons pas nous affranchir du stress de l'hôte qui pourrait être aussi à l'origine de cette modification du profil chimique. Une étude plus approfondie de la variabilité chimique *in situ* (que nous avons également observée dans les différents extraits d'éponges collectées lors de ce travail) pourrait permettre de compléter cette étude afin de savoir si, lors de la diminution de pH, nous avons pu provoquer un stress qui conduit aux mêmes effets que ceux qui sont liés à des conditions environnementales en mer (pression de prédation, compétition pour l'espace, stress abiotique...). L'étude de l'effet d'un stress en condition contrôlée reste donc une piste intéressante à explorer pour appréhender le fonctionnement de cette symbiose et il serait intéressant de confirmer les résultats en la menant en réplicat et en la complétant par l'étude de la composition de la communauté microbienne par fluorescence *in situ* (CARD-FISH) ainsi que par une analyse méta-transcriptomique des tissus aux différents temps de l'expérience.

L'étude de la distribution spatiale des composés au sein des tissus de l'éponge peut également permettre d'apporter des hypothèses quant au(x) type(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans leur synthèse. De ce fait, nous nous sommes intéressés à la distribution spatiale *in situ* des alcaloïdes au sein des tissus de *C. crambe* par MALDI-TOF et TOF-SIMS. Nous sommes bien conscients que la localisation des composés ne suffit pas à

prouver qui de l'éponge ou des micro-organismes fabrique ces molécules, les composés pouvant diffuser ou être exportés de leurs lieux de production vers des lieux de stockage (Hildebrand et al., 2004). La toxicité de *C. crambe* a été localisée lors de précédentes études au sein des cellules sphéruleuses de l'éponge (Uriz et al., 1996 ; Becerro et al., 1997), cependant les auteurs n'ont pas démontré que cette activité était due à la présence des alcaloïdes guanidiniques puisqu'aucune analyse chimique d'extrait spécifique des cellules sphéruleuses n'a été réalisée. Par manque de temps, il n'a pas été possible, lors de ce travail, de reproduire le tri cellulaire décrit par Uriz et collaborateurs afin d'analyser le contenu des cellules sphéruleuses. Cependant, nous avons choisi d'accéder à la distribution spatiale des composés au sein des tissus de *C. crambe* par des techniques d'imagerie en MALDI-ToF et ToF-SIMS. Très prometteuses, elles ne nécessitent pas de tri préalable et permettent de visualiser directement et sélectivement les composés ciblés au sein des organismes avec une technique sensible et performante. Même si cette technique très utilisée dans le domaine médical est encore très peu appliquée à l'étude des métabolites marins, il a été montré que les données de distribution spatiale des métabolites *in situ* permettent d'émettre des hypothèses quand à leurs rôles mais également quant au(x) type(s) cellulaire(s) pouvant être impliqué(s) dans leurs synthèses (Simmons et al., 2008 ; Esquenazi et al., 2008 ; Yarnold et al., 2012). L'étape critique de ces techniques réside principalement dans la préparation des échantillons (Yarnold et al. 2012). La fixation des tissus est nécessaire afin de conserver les structures cellulaires et espérer observer l'ectoderme, les chambres choanocytaires et le mésohyle dans lequel sont retrouvés les micro-organismes de façon diffuse. Cependant, les essais de fixation des tissus que nous avons réalisés selon des techniques classiques utilisées en microscopie ou des protocoles inspirés de la littérature (Yarnold

et al., 2012) ont, semble-t-il, conduit à la diffusion des métabolites ciblés et on observerait une délocalisation plus ou moins nette des alcaloïdes. Une analyse plus poussée des résultats est actuellement en cours car bien qu'on observe, sur certains clichés, des alcaloïdes en dehors des tissus, il n'est pas impossible d'envisager que cela soit le résultat de l'explosion de quelques cellules sphéruleuses lors des coupes. Ceci n'est pas à exclure compte tenu de l'hypothèse de stockage des métabolites actifs dans ces cellules qui a été émise. Il semblerait également que les deux sous-familles d'alcaloïdes se comportent de manière différente au regard des images spécifiques obtenues pour la crambescine C1 et la crambescidine 800. Ce résultat est à confirmer en sélectionnant les masses correspondant aux autres membres des deux sous-familles et en comparant avec les images obtenues pour les deux premières.

De plus, les outils microscopiques couplés à la spectrométrie de masse dont nous disposons ne sont pas suffisants pour espérer observer les micro-organismes au sein du mésophyle de *C. crambe*. Cependant, les composés étant extrêmement bien détectés en spectrométrie de masse MALDI-TOF, l'accent devra être mis sur la préparation du matériel biologique. Il apparaît donc, important d'améliorer les coupes à analyser en concentrant les efforts sur différentes techniques de préparation des échantillons afin de réaliser des coupes sans déchirure (pouvant être confondues avec des chambres choanocytaires) tout en évitant de fixer les tissus. Si nous confirmons que la colle OCT utilisée entraîne les alcaloïdes il faudra tester d'autres méthodes d'inclusion. Un protocole de congélation progressive très lente des tissus devrait limiter la destruction tissulaire et l'éclatement des cellules. Enfin, l'utilisation d'un ultramicrotome pourrait permettre d'obtenir des coupes plus fines qu'avec le cryotome classiquement utilisé.

Ainsi, l'utilisation au cours de ce travail de deux techniques indirectes n'a pas permis d'apporter d'éléments de réponse quant à l'implication ou non de ce micro-organisme symbiotique majoritaire dans la synthèse des composés extraits de *C. crambe*. Cependant, il est envisagé de les réitérer en modifiant les différents points soulevés précédemment.

Afin de répondre à cette problématique, d'autres études peuvent être envisagées. Dans un premier temps, il serait intéressant de comparer la composition des communautés microbiennes associées à l'ensemble des éponges productrices d'alcaloïdes guanidiniques (*Monanchora sp.*, *Batzella sp.*, *Hemimyscale sp.* ; *Ptilocaulis sp.*) par pyroséquençage-454 ou bien, plus directement, de déterminer la présence ou non de la bêtaprotéobactérie spécifique symbiotique de *C. crambe* au sein des tissus de ces autres espèces d'éponge par CARD-FISH (sonde spécifique BET 467). Après avoir vérifié la présence des alcaloïdes dans l'empreinte chimique des espèces collectées, si les espèces d'éponge présentant la même composition chimique ne partagent pas tout ou partie de la communauté microbienne dominante de ces éponges, alors l'implication spécifique de cette bêtaprotéobactérie dans la synthèse des alcaloïdes guanidiniques pourrait être rejetée. La difficulté dans la mise en place de cette expérience est l'obtention des tissus de ces éponges (conservés dans les conditions spécifiques pour chaque étude : congelés pour les analyses de pyroséquençage-454 et fixés pour les études de CARD-FISH) de par la diversité de leurs localisations géographiques. Les tentatives faites pendant cette thèse pour obtenir des spécimens de ces éponges ont toutes échoué.

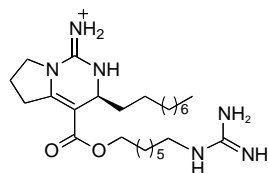
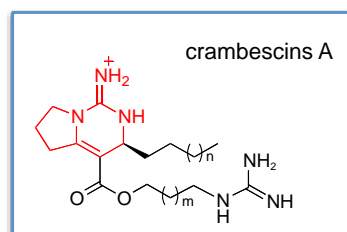
Dans le cas de micro-organismes difficilement cultivables, l'utilisation d'approches génomiques peut se révéler prometteuse dans l'amélioration des connaissances de ces derniers et de leurs éventuels rôles. Du fait de la large dominance de la communauté microbienne associée à *C. crambe* par la bêtaprotéobactérie spécifique, la méthode de séquençage aléatoire global ou « shotgun », est envisageable afin d'obtenir des informations sur le génome de ce micro-organisme (Staden, 1979). Cette méthode repose sur le découpage du génome complet en un grand nombre de fragments de petite taille permettant ainsi leurs séquençages. Ces fragments seront ensuite assemblés sur la base de leurs chevauchements afin d'obtenir une séquence complète. La bêtaprotéobactérie majoritaire associée à *C. crambe* n'étant pas cultivable à ce jour, nous n'avons pas accès directement au génome de celle-ci, cependant du fait de sa dominance au sein de la communauté microbienne, la méthode de séquençage aléatoire global de l'ADN total peut être testée. En partant d'une fraction enrichie en micro-organismes obtenue des tissus de *C. crambe* par centrifugation différentielle (inspirée de Roué et al., 2010), mais également, en se basant sur les différences de contenu génomique (pourcentage de bases G+C, biais de codons, analyse de tétranucléotides (Karlin et al., 1998; Teeling et al., 2004)) entre le génome de l'éponge et celui de la bêtaprotéobactérie, les séquences obtenues issues de l'éponge pourront être analysées séparément de celle de la communauté microbienne. Plus de 70% de la communauté microbienne associée à *C. crambe* étant composée de cette bêtaprotéobactérie spécifique, les chances de pouvoir assembler de larges fragments génomiques obtenus sont importantes. De plus, par chevauchement des séquences à partir de celles qui correspondent à l'ARNr16S spécifique de cette bêtaprotéobactérie nous pouvons obtenir des informations génomiques spécifiques à ce micro-organisme. Cette étude a été

commencée durant ma thèse et les résultats préliminaires semblent prometteurs. Le gène codant pour l'ARNr16S de cette bêtaprotéobactérie spécifique ne semble pas être lié à celui codant pour l'ARNr23S, ce qui est observé chez plusieurs organismes symbiotiques (Bensaadi-Merchermek et al., 1995 ; Rurangirwa et al., 2002). Nous avons également pu mettre en évidence la présence de séquences répétées de tetratricopeptides (TRP). Ce motif répété a été mis en évidence au sein du métagénome microbien obtenu de l'éponge *Cymbastella concentrica* (Thomas et al., 2010) ainsi que chez les Poribactéries symbiotiques d'éponges (Siegl et al., 2011 ; Kamke et al., 2014). Il interviendrait dans la discrimination entre les bactéries symbiotiques et celles qui sont utilisées à des fins alimentaires. Ces deux observations confirment la symbiose entre cette bêtaprotéobactérie spécifique et *C. crambe*. Un autre élément important émerge de cette analyse : aucune séquence correspondant aux différents modules des polycétides-synthases n'a été observée. Ceci semble prouver que la biosynthèse de ces alcaloïdes pentacycliques ne se fait pas par l'intervention de polycétides-synthases et donc permet d'infirmer les hypothèses publiées à ce jour. La recherche de séquences correspondant aux enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et plus particulièrement des acides gras polyinsaturés (en lien avec les structures des nouveaux alcaloïdes insaturés) apparaît comme une nouvelle piste à envisager pour en apprendre plus sur leur biosynthèse. L'étude est toujours en cours afin d'obtenir des informations sur le rôle de ce micro-organisme spécifique au sein de *C. crambe*.

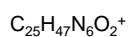
Nous pourrions également envisager la technique du tri cellulaire afin d'isoler une cellule de la bêtaprotéobactérie spécifique de *C. crambe* et d'étudier son génome ou « single cell genomic ». Le « single cell genomic » est un outil utilisé dans l'étude des génomes des micro-organismes non cultivables et notamment ceux des symbiontes

d'éponges (Siegl et al., 2011 ; Kamke et al., 2012, 2013, 2014). Cette technique permet de relier l'identité phylogénétique à la fonction du micro-organisme cible sans qu'il ne soit nécessaire de le cultiver (Swan et al., 2011). Elle a ainsi permis d'augmenter les connaissances sur le(s) rôle(s) de ces micro-organismes symbiotiques au sein de leur hôte et notamment ceux des Poribactéries, micro-organismes spécifiques des éponges (Fieseler et al., 2004 ; Lafi et al., 2009). Il a récemment été montré par « single cell genomic », que les Poribactéries ne seraient pas membres du superphylum Planctomyces-Verrucomicrobia-Chlamydia mais qu'elles constitueraient un phylum monophylétique distinct (Kamke et al., 2014) ; et qu'elles posséderaient divers rôles au sein de l'éponge hôte (Siegl et al., 2011 ; Kamke et al., 2013 ; Kamke et al., 2014). Ainsi le «single cell genomic » représente un outil prometteur pour obtenir des informations sur le rôle de cette bêtaprotéobactérie spécifique au sein des tissus de *C. crambe*. L'obtention d'une cellule individualisée est la première étape de cette technique (Kamke et al., 2012), ainsi des essais de tris cellulaires afin d'isoler une cellule de bêtaprotéobactérie majoritaire des tissus de *C. crambe* sont actuellement en cours au sein de notre équipe de recherche.

Annexes

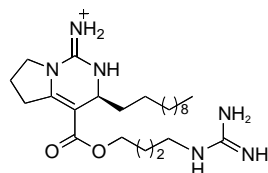


crambescin A1

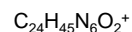


$$[\text{M}+\text{H}]^+ = 463.37550$$

$$[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 232.19139$$

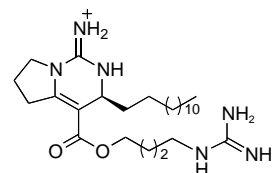


norcrambescin A2

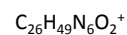


$$[\text{M}+\text{H}]^+ = 449.35985$$

$$[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 225.18356$$

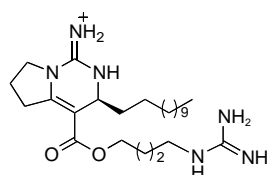


homocrambescin A2

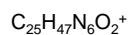


$$[\text{M}+\text{H}]^+ = 477.39115$$

$$[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 239.19921$$

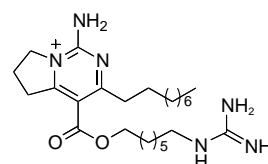


crambescin A2

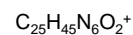


$$[\text{M}+\text{H}]^+ = 463.37550$$

$$[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 232.19139$$



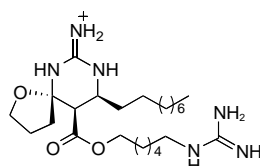
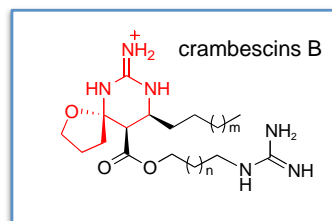
didehydrocrambescin A1



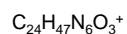
$$[\text{M}+\text{H}]^+ = 461.35985$$

$$[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 231.18356$$

Annexe 1 : Structures des crambescines isolées de *C. crambe*.

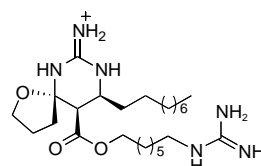


norcrambescin B1

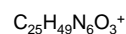


$$[M+H]^+ = 467.37042$$

$$[M+2H]^{2+} = 234.18885$$

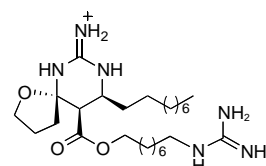


crambescin B1

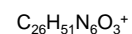


$$[M+H]^+ = 481.38607$$

$$[M+2H]^{2+} = 241.19167$$

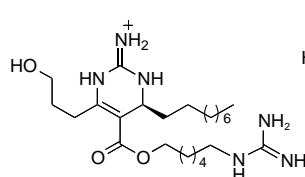
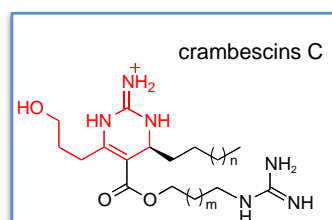


homocrambescin B1

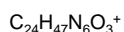


$$[M+H]^+ = 495.40172$$

$$[M+2H]^{2+} = 248.20450$$

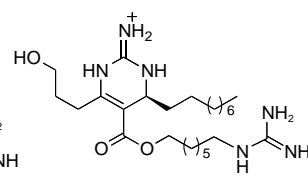


norcrambescin C1

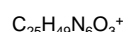


$$[M+H]^+ = 467.37042$$

$$[M+2H]^{2+} = 234.18885$$

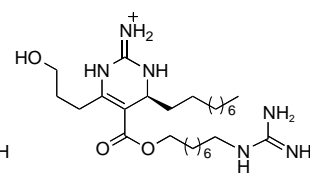


crambescin C1

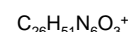


$$[M+H]^+ = 481.38607$$

$$[M+2H]^{2+} = 241.19167$$



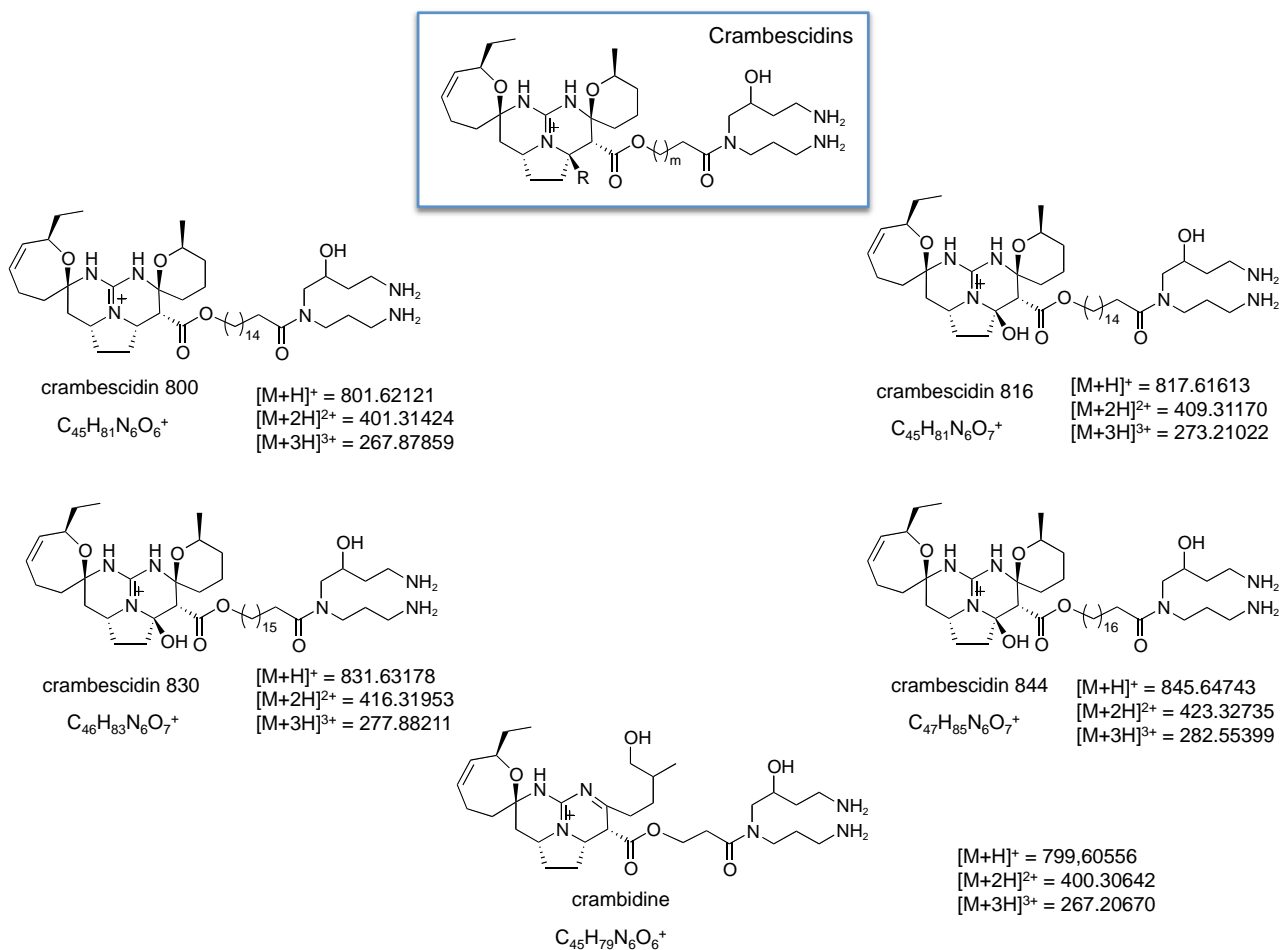
homocrambescin C1



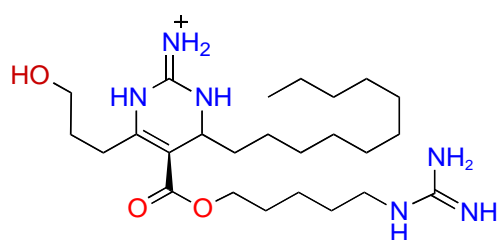
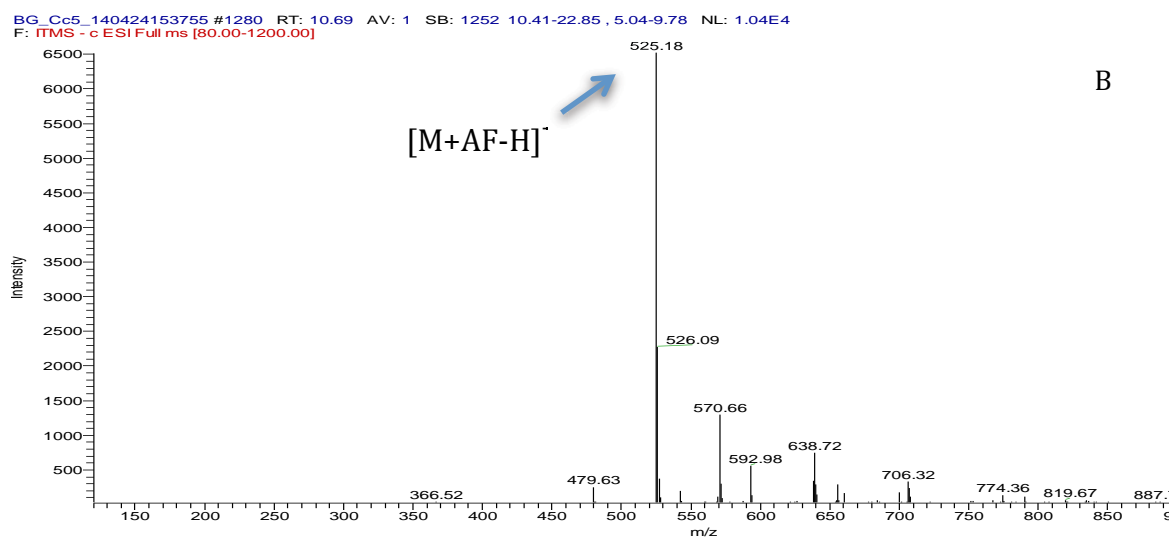
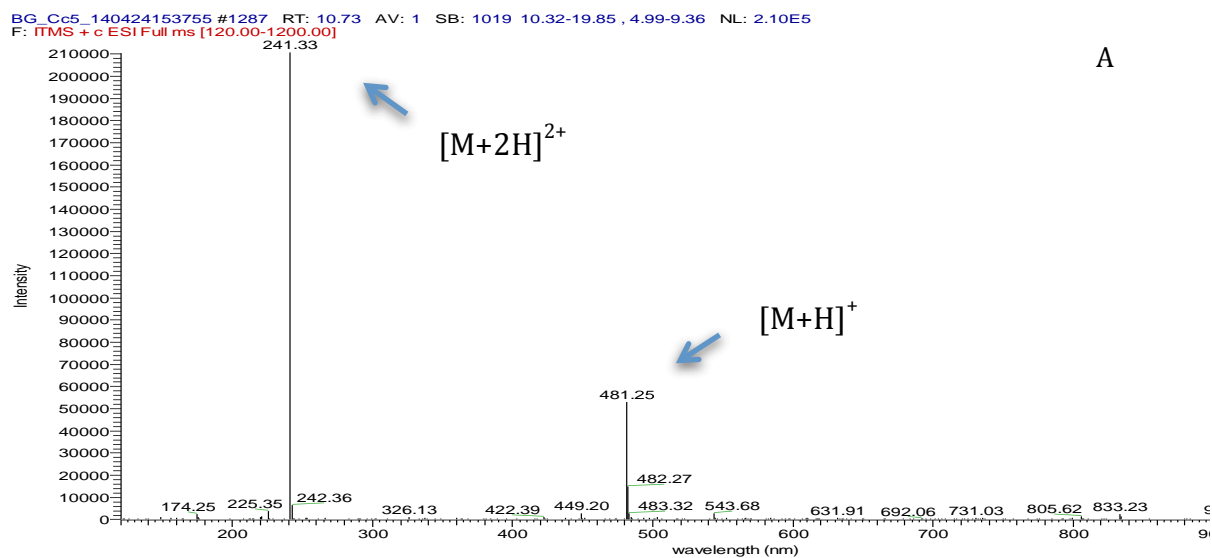
$$[M+H]^+ = 495.40172$$

$$[M+2H]^{2+} = 248.20450$$

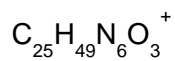
Annexe 1 (suite) : Structures des crambescines isolées de *C. crambe*.



Annexe 2 : Structures des crambescidines isolées de *C. crambe*.

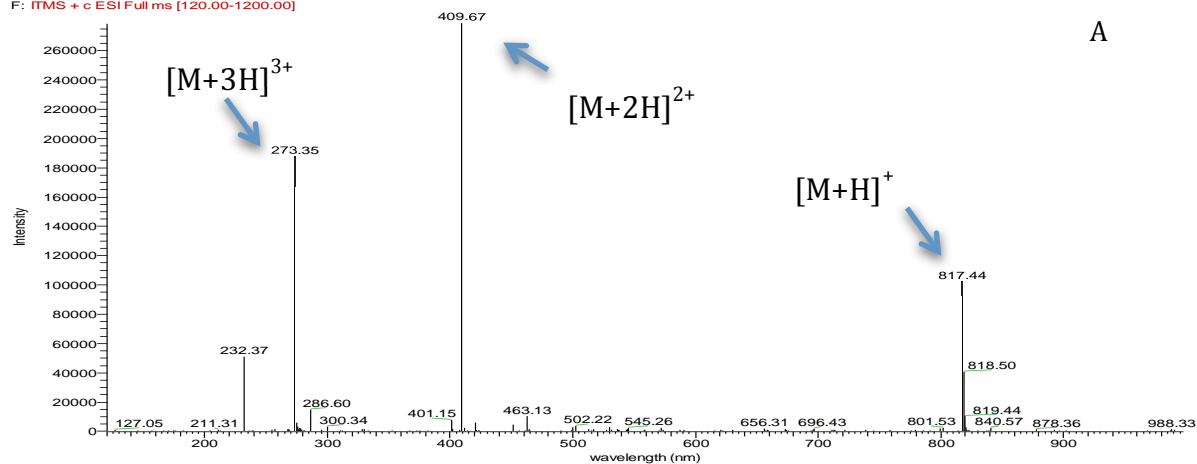


crambescine C1

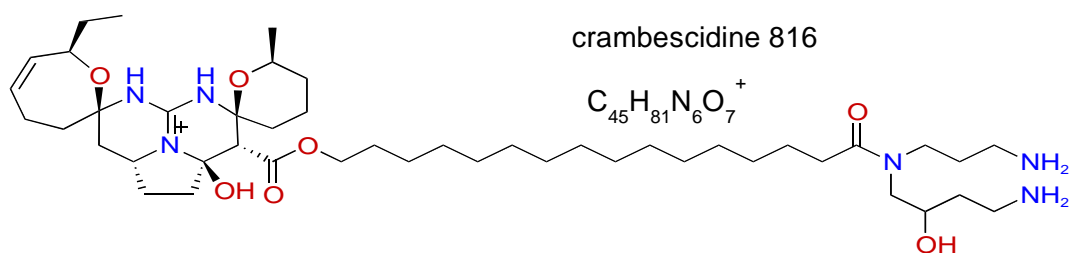
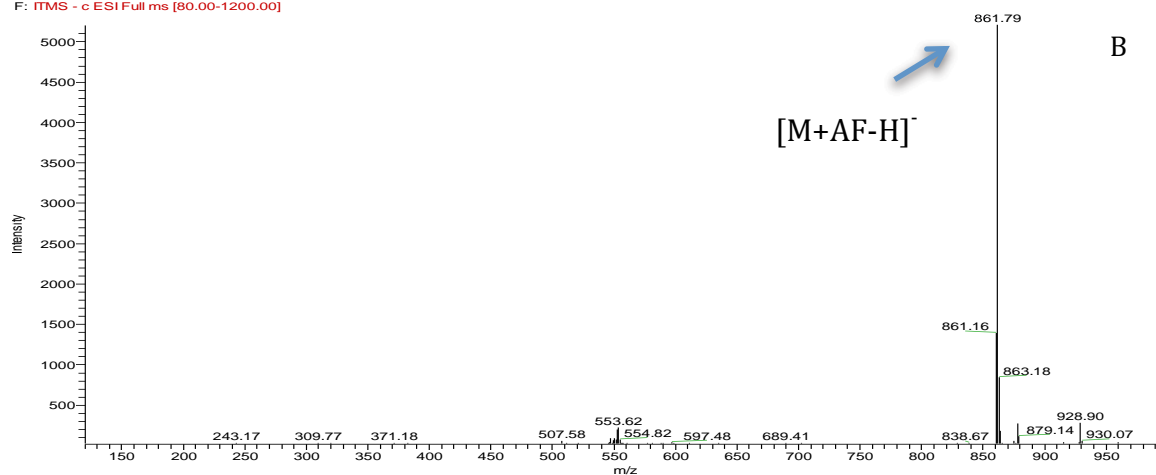


Annexe 3 : Spectres de masse en mode positif (A) et négatif (B) de la crambescine C1 au temps de rétention 10,71 minutes.

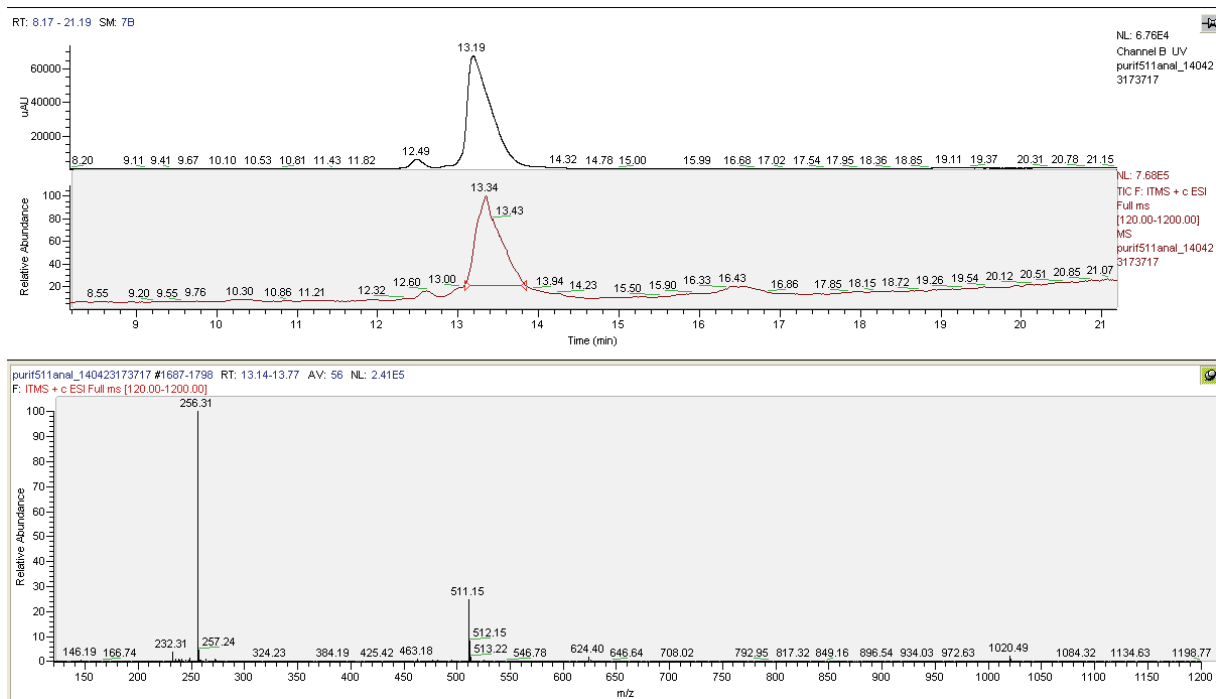
BG_Cc5_140424153755 #2355 RT: 17.88 AV: 1 SB: 889 14.44-21.18 , 8.74-14.07 NL: 2.78E5
F: ITMS + c ESI Full ms [120.00-1200.00]



BG_Cc5_140424153755 #2350 RT: 17.85 AV: 1 SB: 1260 14.56-22.89 , 5.20-14.19 NL: 8.35E3
F: ITMS - c ESI Full ms [80.00-1200.00]



Annexe 4 : Spectres de masse en mode positif (A) et négatif (B) de la crambescine C1 au temps de rétention 17,83 minutes.



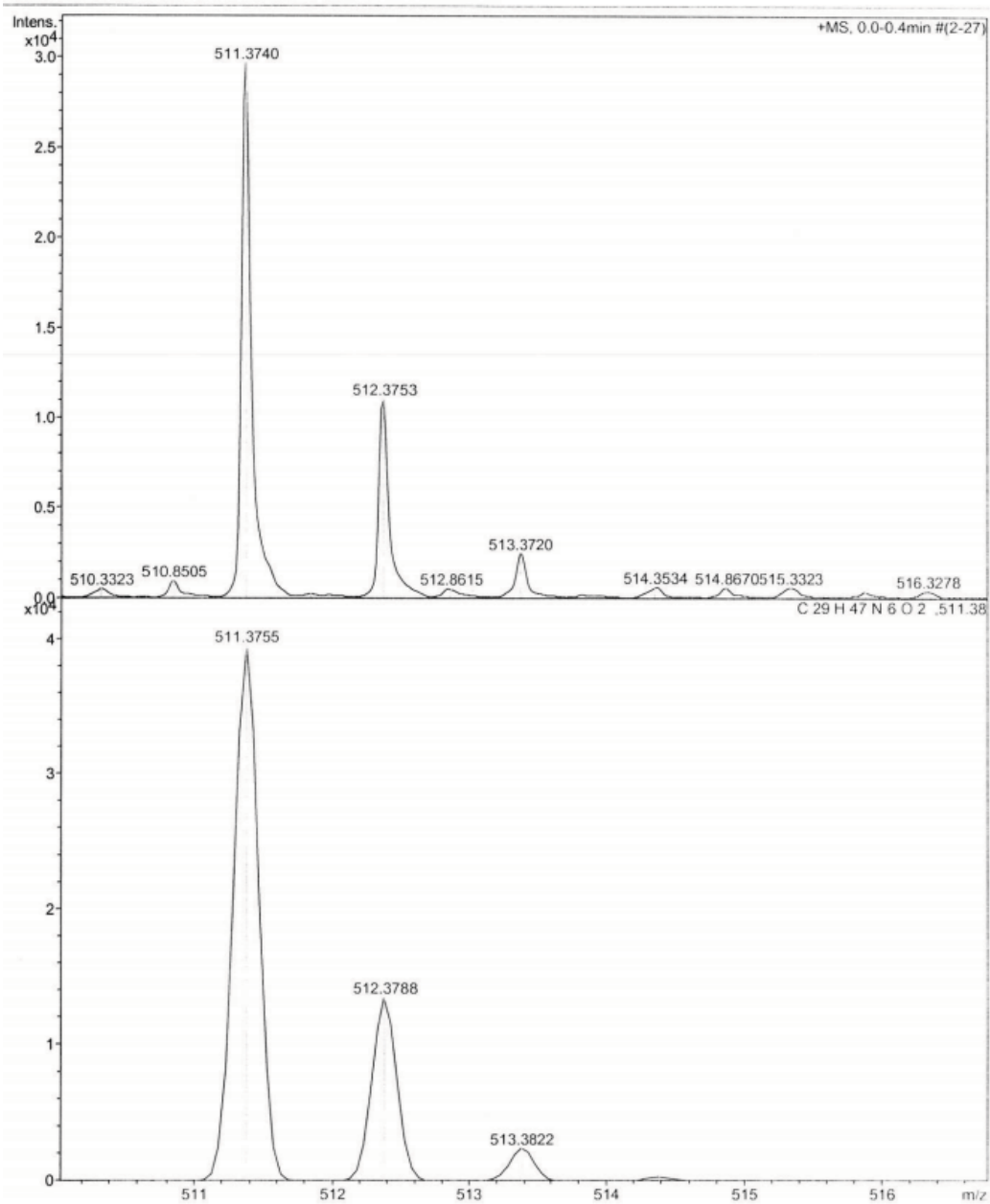
Annexe 5 : Analyse du composé purifié en LC/MS.

Analysis Info

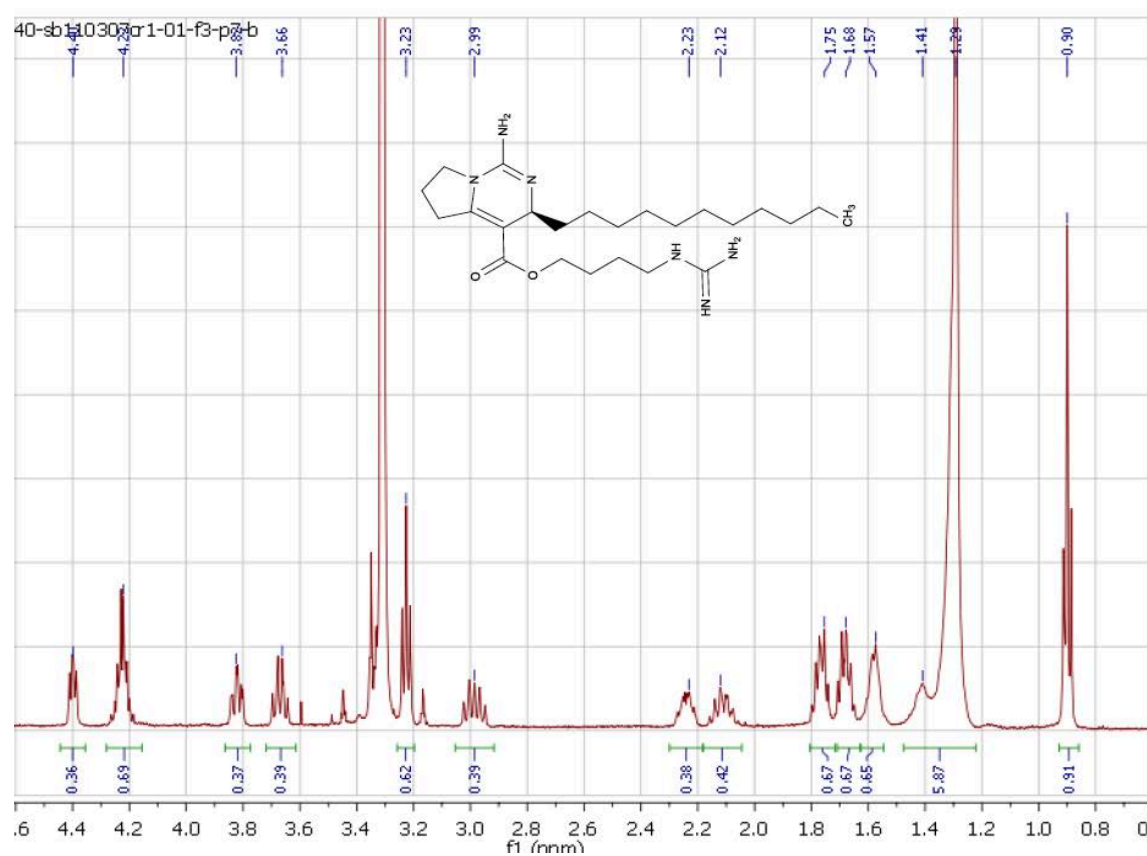
Analysis Name D:\Data\CL\CL000057.d
 Method INFUSION_060314.m
 Sample Name CC511
 Comment

Acquisition Date 05/06/2014 10:47:51

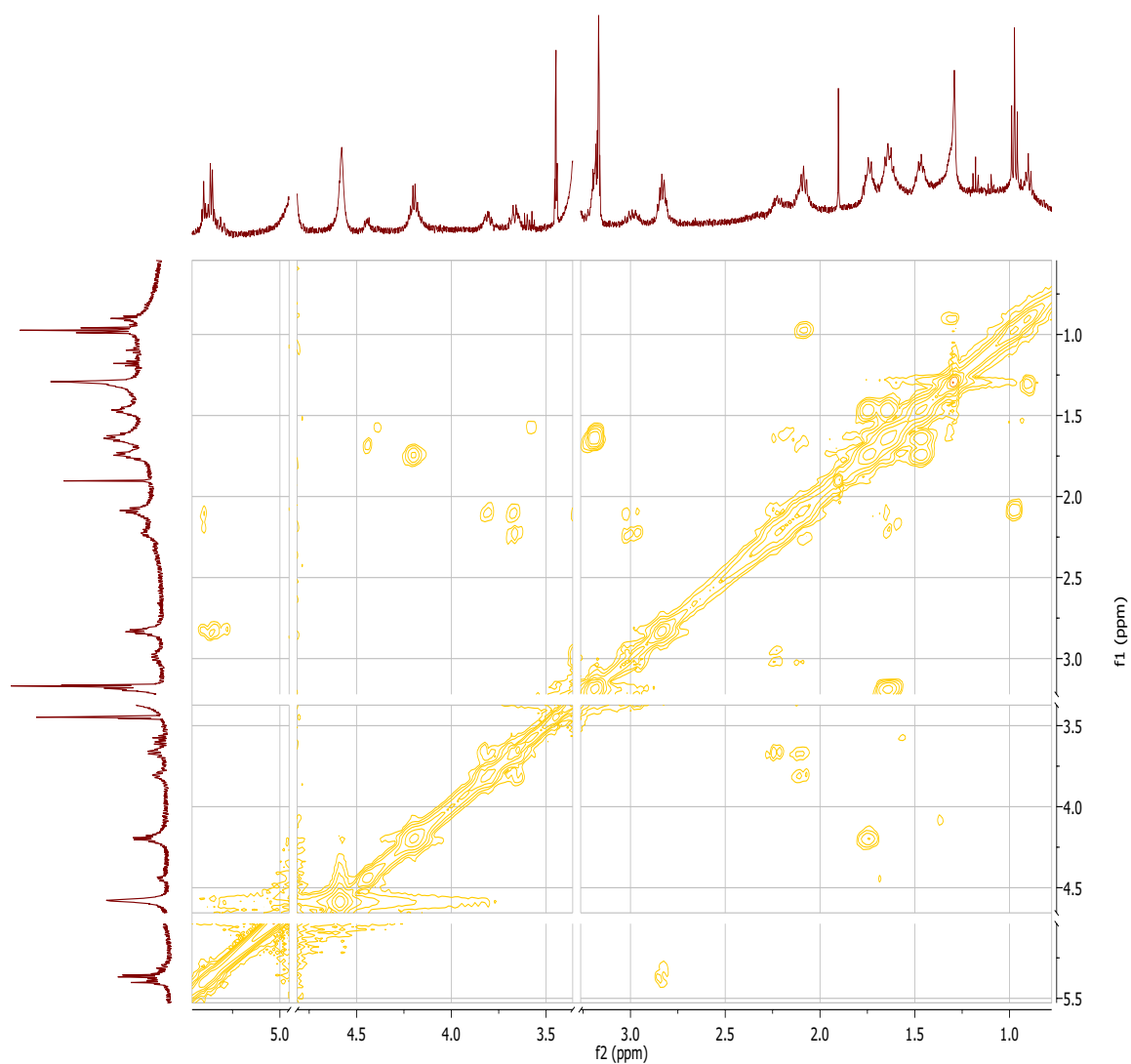
Operator LONG CHRISTOPHE
 Instrument microTOF



Annexe 6 : Spectre de masse haute résolution du composé isolé.



Annexe 7 : Spectre de RMN de la crambescine A2 (500 MHz, CD₃OD) (Bondu et al, supplementary material).



Annexe 8 : Spectre de RMN COSY H-H du composé isolé (500 MHz, CD₃OD).

Bibliographie

A

- Agogu , H., Joux, F., Obernosterer, I., & Lebaron, P. (2005). Resistance of Marine Bacterioneuston to Solar Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5282-5289. doi :10.1128/AEM.71.9.5282-5289.2005
- Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Batel, R., & M ller, W. E. G. (1998). Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria? *Marine Biology*, 130(3), 529-536. doi:10.1007/s002270050273
- Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 762-770.
- Ang, K. K. H., Holmes, M. J., Higa, T., Hamann, M. T., & Kara, U. A. K. (2000). In Vivo Antimalarial Activity of the Beta-Carboline Alkaloid Manzamine A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1645-1649. doi:10.1128/AAC.44.6.1645-1649.2000
- Aoki, S., Kong, D., Matsui, K., & Kobayashi, M. (2004). Erythroid Differentiation in K562 Chronic Myelogenous Cells Induced by Crambescidin 800, a Pentacyclic Guanidine Alkaloid. *Anticancer Research*, 24(4), 2325-2330.
- Arillo, A., Bavestrello, G., Burlando, B., & Sar , M. (1993). Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges: a possible mechanism. *Marine Biology*, 117(1), 159-162. doi:10.1007/BF00346438

B

- Bakus, G. J., Targett, N. M., & Schulte, B. (1986). Chemical ecology of marine organisms: An overview. *Journal of Chemical Ecology*, 12(5), 951-987. doi:10.1007/BF01638991
- Barison, A., Pereira da Silva, C. W., Campos, F. R., Simonelli, F., Lenz, C. A., & Ferreira, A. G. (2010a). A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(8), 642-650. doi:10.1002/mrc.2629
- Beavis, R. C., Chait, B. T., & Fales, H. M. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3(12), 432-435. doi:10.1002/rcm.1290031207
- Beavis, R. C., Chaudhary, T., & Chait, B. T. (1992). α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 27(2), 156-158. doi:10.1002/oms.1210270217
- Becerro, M. A., Lopez, N. I., Turon, X., & Uriz, M. J. (1994). Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 179(2), 195-205. doi:10.1016/0022-0981(94)90114-7
- Becerro, M. A., Uriz, M. J., & Turon, X. (1997). Chemically-mediated interactions in benthic

- organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida). *Hydrobiologia*, 355(1-3), 77-89. doi:10.1023/A:1003019221354
- Becerro, M. A., Uriz, M. J., Maldonado, M., & Turon, X. (2012). Advances in Marine Biology. Advances in Sponge Science: Physiology, Chemical and Microbial Diversity, Biotechnology. Academic Press, volume 62.
- Belarbi, E. H., Contreras Gómez, A., Chisti, Y., García Camacho, F., & Molina Grima, E. (2003). Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances*, 21(7), 585-598. doi:10.1016/S0734-9750(03)00100-9
- Bensaadi-Merchermek, N., Salvado, J.-C., Cagnon, C., Karama, S., & Mouchès, C. (1995). Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S-5S rRNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prokaryotic parasite of insect gonads. *Gene*, 165(1), 81-86. doi:10.1016/0378-1119(95)00539-1
- Bensemhoun, J., Bombarda, I., Aknin, M., Vacelet, J., & Gaydou, E. M. (2007). Ptilomycalin D, a Polycyclic Guanidine Alkaloid from the Marine Sponge *Monanchora dianchora*. *Journal of Natural Products*, 70(12), 2033-2035. doi:10.1021/np070340z
- Bergmann, W., & Feeney, R. J. (1950). The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society*, 72(6), 2809-2810. doi:10.1021/ja01162a543
- Bergmann, W., & Feeney, R. J. (1951). Contributions to the study of marine products. 32. The nucleosides of sponges. *Journal of Organic Chemistry*, 16(6), 981-987. doi:10.1021/jo01146a023
- Bergquist, P. R. (1978). *Sponges*. UC Press, Berkeley.
- Bergquist, P. R. (2001). "Porifera (Sponges)". *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1038/npg.els.0001582
- Berlinck, R. G. S., Braekman, J. C., Daloze, D., Bruno, I., Riccio, R., Ferri, S., ... Speroni, E. (1993). Polycyclic Guanidine Alkaloids from the Marine Sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ Channel Blocker Activity of Crambescidin 816. *Journal of Natural Products*, 56(7), 1007-1015. doi:10.1021/np50097a004
- Berlinck, R. G. S., Braekman, J. C., Daloze, D., Bruno, I., Riccio, R., Rogeau, D., & Amade, P. (1992). Crambines C1 and C2: Two Further Ichthyotoxic Guanidine Alkaloids from the Sponge *Crambe crambe*. *Journal of Natural Products*, 55(4), 528-532. doi:10.1021/np50082a026
- Berlinck, R. G. S., Braekman, J. C., Daloze, D., Hallenga, K., Ottinger, R., Bruno, I., & Riccio, R. (1990). Two new guanidine alkaloids from the mediterranean sponge *Crambe crambe*. *Tetrahedron Letters*, 31(45), 6531-6534. doi:10.1016/S0040-4039(00)97109-0
- Berlinck, R. G. S., Burtoloso, A. C. B., & Kossuga, M. H. (2008). The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Natural Product Reports*, 25(5), 919-954. doi:10.1039/B507874C
- Bewley, C. A., & Faulkner, D. J. (1998). Lithistid Sponges: Star Performers or Hosts to the Stars. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(16), 2162-2178.

- doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980904)37:16<2162::AID-ANIE2162>3.0.CO;2-2
- Bewley, C. A., Holland, N. D., & Faulkner, D. J. (1996). Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia*, 52(7), 716-722. doi:10.1007/BF01925581
- Blanquer, A., Uriz, M. J., & Galand, P. E. (2013). Removing environmental sources of variation to gain insight on symbionts vs. transient microbes in high and low microbial abundance sponges. *Environmental Microbiology*, 15(11), 3008-3019. doi:10.1111/1462-2920.12261
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2012). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 29(2), 144-222. doi:10.1039/C2NP00090C
- Bode, H. B., & Müller, R. (2005). The Impact of Bacterial Genomics on Natural Product Research. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(42), 6828-6846. doi:10.1002/anie.200501080
- Bondu, S., Genta-Jouve, G., Leirós, M., Vale, C., Guigonis, J.-M., Botana, L. M., & Thomas, O. P. (2012). Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. *RSC Advances*, 2(7), 2828-2835. doi:10.1039/C2RA00045H
- Bourguet-Kondracki, M.-L., Longeon, A., Debitus, C., & Guyot, M. (2000). New cytotoxic isomalabaricane-type sesterterpenes from the New Caledonian marine sponge *Rhabdastrella globostellata*. *Tetrahedron Letters*, 41(17), 3087-3090. doi:10.1016/S0040-4039(00)00345-2
- Boury-Esnault, N. (1971). Spongiaires de la zone rocheuse de Banyuls-sur-Mer. II- Systématique. *Vie et Milieu*, 22(2), 287-349
- Brusca R. C., and Brusca G. J. (1990). Invertebrates. Sinauer Associated, Inc., Publishers.
- Burkholder, P.R., & Ruetzler, K. (1969). Antimicrobial activity of some marine sponges. *Nature*, 222, 983-984. doi :10.1038/222983a0
- Burton, M. (1936). Sponges. The fishery grounds near Alexandria. IX. *Notes and Memoirs. Fisheries Research Directorate*, 17, 1-28

C

- Chang, W. N. F., & Bewley, C. A. (2003). Crambescidin 826 and Dehydrocrambine A: New Polycyclic Guanidine Alkaloids from the Marine Sponge *Monanchora* sp. that Inhibit HIV-1 Fusion. *Journal of Natural Products*, 66(11), 1490-1494. doi:10.1021/np030256t
- Choi, J.-H., Kim, M.-S., Roh, S. W., & Bae, J.-W. (2010). *Acidovorax soli* sp. nov., isolated from landfill soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2715-2718. doi:10.1099/ij.s.0.019661-0
- Croué, J., West, N. J., Escande, M.-L., Intertaglia, L., Lebaron, P., & Suzuki, M. T. (2013). A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*. *Scientific Reports*, 3. doi:10.1038/srep02583

D

- De Bary, A. (1879). « The Phenomenon of Symbiosis », privately printed in Strasburg
- De Caralt, S., Uriz, M. J., & Wijffels, R. H. (2007). Vertical transmission and successive location of symbiotic bacteria during embryo development and larva formation in *Corticium candelabrum* (Porifera: Demospongiae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(6), 1693-1699. doi:10.1017/S0025315407056846
- Debitus, C., Guella, G., Mancini, I., Waikedre, J., Guemas, J. P., Nicolas, J. L., & Pietra, F. (1998). Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea. *Journal of Marine Biotechnology*, 6(3), 136-141.
- De Hoffman, E., Charrette, J., Stroobant, V. (1999). Spectrométrie de masse, Dunod, 2^{ème} édition, p 26.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, 243(4896), 1360-1363. doi:10.1126/science.2466341
- Dupont, S., Corre, E., Li, Y., Vacelet, J., & Bourguet-Kondracki, M.-L. (2013). First insights into the microbiome of a carnivorous sponge. *FEMS Microbiology Ecology*, 86(3), 520-531. doi:10.1111/1574-6941.12178
- Duran, S., Pascual, M., & Turon, X. (2004). Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Marine Biology*, 144(1), 31-35. doi:10.1007/s00227-003-1178-5

E

- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H. J., & Proksch, P. (1997). Wound Activation of Protoxins in Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(5), 1451-1462. doi:10.1023/B:JOEC.0000006475.10310.3a
- Elyakov, G. B., Kuznetsova, T., Mikhailov, V. V., Maltsev, I. I., Voinov, V. G., & Fedoreyev, S. A. (1991). Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia*, 47(6), 632-633. doi:10.1007/BF01949894
- Enticknap, J. J., Kelly, M., Peraud, O., & Hill, R. T. (2006). Characterization of a Culturable Alphaproteobacterial Symbiont Common to Many Marine Sponges and Evidence for Vertical Transmission via Sponge Larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3724-3732. doi:10.1128/AEM.72.5.3724-3732.2006
- Erpenbeck, D., Breeuwer, J., Velde, H. van der, & Soest, R. van. (2002). Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Marine Biology*, 141(2), 377-386. doi:10.1007/s00227-002-0785-x
- Erwin, P. M., Olson, J. B., & Thacker, R. W. (2011). Phylogenetic Diversity, Host-Specificity and Community Profiling of Sponge-Associated Bacteria in the Northern Gulf of Mexico. *PLoS ONE*, 6(11), e26806. doi:10.1371/journal.pone.0026806

- Erwin, P. M., Pita, L., López-Legentil, S., & Turon, X. (2012). Stability of Sponge-Associated Bacteria over Large Seasonal Shifts in Temperature and Irradiance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7358-7368. doi:10.1128/AEM.02035-12
- Esquenazi, E., Coates, C., Simmons, L., Gonzalez, D., Gerwick, W. H., & Dorrestein, P. C. (2008). Visualizing the spatial distribution of secondary metabolites produced by marine cyanobacteria and sponges via MALDI-TOF imaging. *Molecular BioSystems*, 4(6), 562-570. doi:10.1039/B720018H

F

- Fan, L., Reynolds, D., Liu, M., Stark, M., Kjelleberg, S., Webster, N. S., & Thomas, T. (2012). Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), E1878-E1887. doi:10.1073/pnas.1203287109
- Faulkner, D. J., Harper, M. K., Salomon, C. E. & Schmidt, E. W. (1999). Localisation of bioactive metabolites in marine sponges. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44(1-2), 167-173.
- Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M., & Hentschel, U. (2004). Discovery of the Novel Candidate Phylum « Poribacteria » in Marine Sponges. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3724-3732. doi:10.1128/AEM.70.6.3724-3732.2004
- Fieseler, L., Quaiser, A., Schleper, C., & Hentschel, U. (2006). Analysis of the first genome fragment from the marine sponge-associated, novel candidate phylum Poribacteria by environmental genomics. *Environmental Microbiology*, 8(4), 612-624. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00937.x
- Fisch, K. M., Gurgui, C., Heycke, N., van der Sar, S. A., Anderson, S. A., Webb, V. L., ... Piel, J. (2009). Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nature Chemical Biology*, 5(7), 494-501. doi:10.1038/nchembio.176
- Friedrich, A. B., Fischer, I., Proksch, P., Hacker, J., & Hentschel, U. (2001). Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiology Ecology*, 38(2-3), 105-115. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00888.x
- Friedrich, A. B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P., & Hentschel, U. (1999). Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Marine Biology*, 134(3), 461-470. doi:10.1007/s002270050562
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). REGULATION OF GENE EXPRESSION BY CELL-TO-CELL COMMUNICATION: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 439-468. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090913
- Fusetani, N. (2011). Antifouling marine natural products. *Natural Product Reports*, 28(2),

G

- Gaino, E., Burlando, B., Buffa, P., & Sarà, M. (1987). Ultrastructural study of the mature egg of *Tethya citrina* sarà and melone (porifera, demospongiae). *Gamete Research*, 16(3), 259-265. doi:10.1002/mrd.1120160308
- Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Höfle, G., & Müller, R. (2002). The Biosynthesis of the Aromatic Myxobacterial Electron Transport Inhibitor Stigmatellin Is Directed by a Novel Type of Modular Polyketide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13082-13090.
- Gallimore, W. A., Kelly, M., & Scheuer, P. J. (2005). Alkaloids from the Sponge *Monanchora unguifera*. *Journal of Natural Products*, 68(9), 1420-1423. doi:10.1021/np050149u
- Gao, Z.-M., Wang, Y., Lee, O. O., Tian, R.-M., Wong, Y. H., Bougouffa, S., ... Qian, P.-Y. (2014). Pyrosequencing Reveals the Microbial Communities in the Red Sea Sponge *Carteriospongia foliascens* and Their Impressive Shifts in Abnormal Tissues. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-014-0419-0
- Garson, M. J., Flowers, A. E., Webb, R. I., Charan, R. D., & McCaffrey, E. J. (1998). A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: cellular origin of cytotoxic alkaloids by Percoll density gradient fractionation. *Cell and Tissue Research*, 293(2), 365-373. doi:10.1007/s004410051128
- Gerçe, B., Schwartz, T., Voigt, M., Rühle, S., Kirchen, S., Putz, A., ... Hausmann, R. (2009). Morphological, Bacterial, and Secondary Metabolite Changes of *Aplysina aerophoba* upon Long-Term Maintenance Under Artificial Conditions. *Microbial Ecology*, 58(4), 865-878. doi:10.1007/s00248-009-9560-6
- Gernert, C., Glöckner, F. O., Krohne, G., & Hentschel, U. (2005). Microbial diversity of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. *Microbial Ecology*, 50(2), 206-212. doi:10.1007/s00248-004-0172-x
- Giles, E. C., Kamke, J., Moitinho-Silva, L., Taylor, M. W., Hentschel, U., Ravasi, T., & Schmitt, S. (2013). Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(1), 232-241. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01467.x
- Gloeckner, V., Hentschel, U., Ereskovsky, A. V., & Schmitt, S. (2013). Unique and species-specific microbial communities in *Oscarella lobularis* and other Mediterranean *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha). *Marine Biology*, 160(4), 781-791. doi:10.1007/s00227-012-2133-0
- Goffredi, S. K., Kantor, A. H., & Woodside, W. T. (2011). Aquatic Microbial Habitats Within a Neotropical Rainforest: Bromeliads and pH-Associated Trends in Bacterial Diversity and Composition. *Microbial Ecology*, 61(3), 529-542. doi:10.1007/s00248-010-9781-8
- Guan, L. L., Onuki, H., & Kamino, K. (2000). Bacterial Growth Stimulation with Exogenous Siderophore and Synthetic N-Acyl Homoserine Lactone Autoinducers under Iron-

Limited and Low-Nutrient Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2797-2803. doi:10.1128/AEM.66.7.2797-2803.2000

H

- Hahn, M. W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Höfle, M. G., Boenigk, J., & Stadler, P. (2003). Isolation of Novel Ultramicrobacteria Classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1442-1451. doi:10.1128/AEM.69.3.1442-1451.2003
- Harrison, F. W., & Cowden, R. R. (1976). *Aspects of Sponge Biology*. Academic Press, New York.
- Hart, J. B., Lill, R. E., Hickford S. J. H, Blunt J. W. & Munro M. H. G. (2000) The Halichondrins : Chemistry, Biology, Supply and delivery. *In Drugs from the seas*, pp 134-153. doi: 10.1159/000062488
- He, L.-M., Li, Z.-Y., Wu, J., Hu, Y., & Jiang, Q. (2006). [Revelation and phylogenetic analysis of the predominant bacterial community associated with sponges in the South China Sea based on PCR- DGGE fingerprints]. *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica*, 46(3), 487-491.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., & Horn, M. (2003). Microbial Diversity of Marine Sponges. In P. D. W. E. G. Müller (Éd.), *Sponges (Porifera)* (p. 59-88). Springer Berlin Heidelberg. Consulté à l'adresse http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-55519-0_3
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J., & Moore, B. S. (2002). Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4431-4440. doi:10.1128/AEM.68.9.4431-4440.2002
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M., & Taylor, M. W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 641-654. doi:10.1038/nrmicro2839
- Hentschel, U., Schmid, M., Wanger, M., Fieseler, L., Gernert, C., Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbial Ecology*, 35, 305-312. doi :10.1016/S0168-6496(01)00110-6
- Hentschel, U., Usher, K. M., & Taylor, M. W. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(2), 167-177. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x
- Hildebrand, M., Waggoner, L. E., Lim, G. E., Sharp, K. H., Ridley, C. P., & Haygood, M. G. (2004). Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Natural Product Reports*, 21(1), 122-142. doi:10.1039/B302336M
- Hill, R. T. (2004). Microbes from marine sponges: A treasure trove of biodiversity for natural products discovery. In : Bull AT (ed.) *Microbial Diversity and Bioprospecting*, ASM Press, Washington DC, pp. 177-190.
- Hill, R. T., Hamann, M. T., Peraud, O., & Kasanah, N. (2004). Manzamine-producing

- actinomycete. 46pp. Patent : WO2004/013297.
- Hirata, Y., & Uemura, D. (1986). Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure and Applied Chemistry*, 58(5), 701-710. doi:10.1351/pac198658050701
- Hochmuth, T., & Piel, J. (2009). Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges – Evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry*, 70(15–16), 1841-1849. doi:10.1016/j.phytochem.2009.04.010
- Hochmuth, T., Niederkrüger, H., Gernert, C., Siegl, A., Taudien, S., Platzer, M., ... Piel, J. (2010). Linking Chemical and Microbial Diversity in Marine Sponges: Possible Role for Poribacteria as Producers of Methyl-Branched Fatty Acids. *ChemBioChem*, 11(18), 2572-2578. doi:10.1002/cbic.201000510
- Hoffmann, F., Larsen, O., Thiel, V., Rapp, H. T., Pape, T., Michaelis, W., & Reitner, J. (2005). An Anaerobic World in Sponges. *Geomicrobiology Journal*, 22(1-2), 1-10. doi:10.1080/01490450590922505
- Hoffmann, F., Radax, R., Woebken, D., Holtappels, M., Lavik, G., Rapp, H. T., ... Kuypers, M. M. M. (2009). Complex nitrogen cycling in the sponge *Geodia barretti*. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2228-2243. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01944.x
- Hoffmann, F., Røy, H., Bayer, K., Hentschel, U., Pfannkuchen, M., Brümmer, F., & Beer, D. de. (2008). Oxygen dynamics and transport in the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biology*, 153(6), 1257-1264. doi:10.1007/s00227-008-0905-3
- Höller, U., Wright, A. D., Matthee, G. F., König, G. M., Draeger, S., Aust, H.-J., & Schulz, B. (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 104(11), 1354-1365. doi:10.1017/S0953756200003117
- Honig, R. E. (1985). The development of secondary ion mass spectrometry (SIMS): A retrospective. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 66(1), 31-54.
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229. doi:10.1016/S0011-2240(03)00046-4

I

- Isaacs, L. T., Kan, J., Nguyen, L., Videau, P., Anderson, M. A., Wright, T. L., & Hill, R. T. (2009). Comparison of the Bacterial Communities of Wild and Captive Sponge *Clathria prolifera* from the Chesapeake Bay. *Marine Biotechnology*, 11(6), 758-770. doi:10.1007/s10126-009-9192-3

J

- Jares-Erijman, E. A., Ingram, A. L., Carney, J. R., Rinehart, K. L., & Sakai, R. (1993). Polycyclic guanidine-containing compounds from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: the structure of 13,14,15-isocrambescidin 800 and the absolute

- stereochemistry of the pentacyclic guanidine moieties of the crambescidins. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(18), 4805-4808. doi:10.1021/jo00070a012
- Jares-Erijman, E. A., Sakai, R., & Rinehart, K. L. (1991). Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(19), 5712-5715. doi:10.1021/jo00019a049

K

- Kamke, J., Bayer, K., Woyke, T., & Hentschel, U. (2012). Exploring Symbioses by Single-Cell Genomics. *The Biological Bulletin*, 223(1), 30-43. doi :10.2307/41758992
- Kamke, J., Rinke, C., Schwientek, P., Mavromatis, K., Ivanova, N., Sczyrba, A., ... Hentschel, U. (2014). The Candidate Phylum Poribacteria by Single-Cell Genomics: New Insights into Phylogeny, Cell-Compartmentation, Eukaryote-Like Repeat Proteins, and Other Genomic Features. *PLoS ONE*, 9(1), e87353. doi:10.1371/journal.pone.0087353
- Kamke, J., Sczyrba, A., Ivanova, N., Schwientek, P., Rinke, C., Mavromatis, K., ... Hentschel, U. (2013). Single-cell genomics reveals complex carbohydrate degradation patterns in poribacterial symbionts of marine sponges. *The ISME Journal*, 7(12), 2287-2300. doi:10.1038/ismej.2013.111
- Kamke, J., Taylor, M. W., & Schmitt, S. (2010). Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *The ISME Journal*, 4(4), 498-508. doi:10.1038/ismej.2009.143
- Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301. doi:10.1021/ac00171a028
- Karlin, S., Campbell, A. M., & Mrázek, J. (1998). Comparative Dna Analysis Across Diverse Genomes. *Annual Review of Genetics*, 32(1), 185-225. doi:10.1146/annurev.genet.32.1.185
- Kashman, Y., Hirsh, S., McConnell, O. J., Ohtani, I., Kusumi, T., & Kakisawa, H. (1989). Ptilomycalin A :a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin. *Journal of the American Chemical Society*, 111(24), 8925-8926. doi :10.1021/ja00206a029
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M., Mooij, M. J., ... Dobson, A. D. W. (2009). Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. *Marine Biotechnology*, 11(3), 384-396. doi:10.1007/s10126-008-9154-1
- Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S. A., Morrissey, J. P., O'Gara, F., & Dobson, A. D. W. (2014). Evidence of a Putative Deep Sea Specific Microbiome in Marine Sponges. *PLoS ONE*, 9(3), e91092. doi:10.1371/journal.pone.0091092
- Kobayashi, J., & Ishibashi, M. (1993). Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chemical Review*, 93(5), 1753-1769. doi :10.1021/cr00021a005
- Koops, H. P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommerening-Röser, A., & Stehr, G. (1991). Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas*

communis sp. nov., Nitrosomonas ureae sp. nov., Nitrosomonas aestuarii sp. nov., Nitrosomonas marina sp. nov., Nitrosomonas nitrosa sp. nov., Nitrosomonas eutropha sp. nov., Nitrosomonas oligotropha sp. nov. and Nitrosomonas halophila sp. nov. *Journal of General Microbiology*, 137(7), 1689-1699. doi:10.1099/00221287-137-7-1689

Kurahashi, M., & Yokota, A. (2007). Endozoicomonas elysicola gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from the sea slug Elysia ornata. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(3), 202-206. doi:10.1016/j.syapm.2006.07.003

L

Lafi, F. F., Fuerst, J. A., Fieseler, L., Engels, C., Goh, W. W. L., & Hentschel, U. (2009). Widespread Distribution of Poribacteria in Demospongiae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5695-5699. doi:10.1128/AEM.00035-09

Laport, M. S., Santos, O. C. S., & Muricy, G. (2009). Marine Sponges: Potential Sources of New Antimicrobial Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 86-105. doi:10.2174/138920109787048625

Laville, R., Thomas, O. P., Berru  , F., Marquez, D., Vacelet, J., & Amade, P. (2009). Bioactive Guanidine Alkaloids from Two Caribbean Marine Sponges. *Journal of Natural Products*, 72(9), 1589-1594. doi:10.1021/np900244g

Lavy, A., Keren, R., Haber, M., Schwartz, I., & Ilan, M. (2014). Implementing sponge physiological and genomic information to enhance the diversity of its culturable associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(2), 486-502. doi:10.1111/1574-6941.12240

Lazaro, J. E. H., Nitcheu, J., Mahmoudi, N., Ibana, J. A., Mangalindan, G. C., Black, G. P., ... Diquet, B. (2006). Antimalarial Activity of Crambescidin 800 and Synthetic Analogues against Liver and Blood Stage of Plasmodium sp. *The Journal of Antibiotics*, 59(9), 583-590. doi:10.1038/ja.2006.78

Leal, M. C., Puga, J., Ser  dio, J., Gomes, N. C. M., & Calado, R. (2012). Trends in the Discovery of New Marine Natural Products from Invertebrates over the Last Two Decades – Where and What Are We Bioprospecting? *PLoS ONE*, 7(1), e30580. doi:10.1371/journal.pone.0030580

Lee, O. O., Wang, Y., Yang, J., Lafi, F. F., Al-Suwailem, A., Qian, P.-Y. (2011). Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *The ISME Journal*, 5, 650–664. doi :10.1038/ismej.2010.165

Lee, Y.K., Lee, J.H., & Lee, H.K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *Journal of Microbiology*, 39, 254-265.

Lemoine, N., Buell, N., Hill, A., & Hill, M. (2007) Assessing the utility of sponge microbial symbiont communities as models to study global climate change : a case study with *Halichondria bowerbanki*. In *Porifera research : Biodiversity, Innovation and sustainability*. Série Livros, Museu Nacional, pp. 419-424.

- Lévi, C. & Porte, P. (1962) Etude au microscope électronique de l'éponge *Oscarella lobularis* et de sa larve amphiblastula. *Cahier Biologie Marine*, 3, 307-315.
- Liu, M., Fan, L., Zhong, L., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2012). Metaproteogenomic analysis of a community of sponge symbionts. *The ISME Journal*, 6(8), 1515-1525. doi:10.1038/ismej.2012.1

M

- Magnino, G., Sara, A., Lancioni, T., & Gaino, E. (1999). Endobionts of the Coral Reef Sponge *Theonella swinhoei* (Porifera, Demospongiae). *Invertebrate Biology*, 118(3), 213. doi:10.2307/3226993
- Makarieva, T. N., Tabakmaher, K. M., Guzii, A. G., Denisenko, V. A., Dmitrenok, P. S., Kuzmich, A. S., ... Stonik, V. A. (2012). Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra*. *Tetrahedron Letters*, 53(32), 4228-4231. doi:10.1016/j.tetlet.2012.05.162
- Maldonado, M., Cortadella, N., Trillas, M. I., Rützler, K. (2005). Endosymbiotic yeast maternally transmitted in a marine sponge. *Biological Bulletin* 209, 94-106.
- Maldonado, M., & Uriz, M.-J. (1995). Biotic Affinities in a Transitional Zone Between the Atlantic and the Mediterranean: A Biogeographical Approach Based on Sponges. *Journal of Biogeography*, 22(1), 89. doi:10.2307/2846075
- Manconi, R., Cadeddu, B., Ledda, F., & Pronzato, R. (2013). An overview of the Mediterranean cave-dwelling horny sponges (Porifera, Demospongiae). *ZooKeys*, (281), 1-68. doi:10.3897/zookeys.281.4171
- Manuel, M., Boury-Esnault, N., & Vacelet, J. (2003). L'éponge...une république cellulaire. *Revue Pour la Science N°310*
- Marin, A., & Belluga, M. D. L. (2005). Sponge Coating Decreases Predation On The Bivalve *Arca Noae*. *Journal of Molluscan Studies*, 71(1), 1-6. doi:10.1093/mollus/eyh045
- Martín, V., Vale, C., Bondu, S., Thomas, O. P., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2013). Differential Effects of Crambescins and Crambescidin 816 in Voltage-Gated Sodium, Potassium and Calcium Channels in Neurons. *Chemical Research in Toxicology*, 26(1), 169-178. doi:10.1021/tx3004483
- Mohamed, N. M., Rao, V., Hamann, M. T., Kelly, M., & Hill, R. T. (2008). Monitoring Bacterial Diversity of the Marine Sponge *Ircinia strobilina* upon Transfer into Aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4133-4143. doi:10.1128/AEM.00454-08
- Moitinho-Silva, L., Bayer, K., Cannistraci, C. V., Giles, E. C., Ryu, T., Seridi, L., ... Hentschel, U. (2013). Specificity and transcriptional activity of microbiota associated with low and high microbial abundance sponges from the Red Sea. *Molecular Ecology*, 23(6), 1348-1363. doi:10.1111/mec.12365
- Montalvo, N. F., & Hill, R. T. (2011). Sponge-Associated Bacteria Are Strictly Maintained in Two Closely Related but Geographically Distant Sponge Hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7207-7216. doi:10.1128/AEM.05285-11

- Montalvo, N. F., Davis, J., Vicente, J., Pittiglio, R., Ravel, J., & Hill, R. T. (2014). Integration of culture-based and molecular analysis of a complex sponge-associated bacterial community. *PloS One*, 9(3), e90517. doi:10.1371/journal.pone.0090517
- Müller, W. E., Diehl-Seifert, B., Sobel, C., Bechtold, A., Kljajić, Z., & Dorn, A. (1986). Sponge secondary metabolites: biochemical and ultrastructural localization of the antimitotic agent avarol in *Dysidea avara*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 34(12), 1687-1690. doi:10.1177/34.12.3782777
- Müller, W. E., Kurelec, B., Zahn, R. K., Müller, I., Vaith, P., & Uhlenbruck, G. (1979). Aggregation of sponge cells. Function of a lectin in its homologous biological system. *Journal of Biological Chemistry*, 254(16), 7479-7481.
- Müller, W. E., Zahn, R. K., Kurelec, B., Lucu, C., Müller, I., & Uhlenbruck, G. (1981). Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *Journal of Bacteriology*, 145(1), 548-558.
- Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V., & Imhoff, J. F. (2008). Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge-Associated Bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 55(1), 94-106. doi:10.1007/s00248-007-9255-9

N

- Nguyen, M. T. H. D., Liu, M., & Thomas, T. (2014). Ankyrin-repeat proteins from sponge symbionts modulate amoebal phagocytosis. *Molecular Ecology*, 23(6), 1635-1645. doi:10.1111/mec.12384
- Nordsieck, F. (1969). Die europäischen Meeresmuscheln (Bivalvia) vom Eismeer bis Kapverden, Mittelmeer und Schwarzes Meer. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag.

O

- O' Halloran, J. a., Barbosa, T. m., Morrissey, J. p., Kennedy, J., O' Gara, F., & Dobson, A. d. w. (2011). Diversity and antimicrobial activity of *Pseudovibrio* spp. from Irish marine sponges. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), 1495-1508. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05008.x
- Ohtani, I., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kashman, Y., & Hirsh, S. (1992). Structure and chemical properties of ptilomycalin A. *Journal of the American Chemical Society*, 114(22), 8472-8479. doi:10.1021/ja00048a018
- Olson, J.B. and McCarthy, P.J. (2005). Associated bacterial communities of two deep-water sponges. *Aquatic Microbial Ecology*, 39(1), 47-55. doi:10.3354/ame039047
- Osinga, R., Armstrong, E., Burgess, J. G., Hoffmann, F., Reitner, J., & Schumann-Kindel, G. (2001). Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*, 461(1-3), 55-62. doi:10.1023/A:1012717200362
- Ottinger, S., Klöppel, A., Rausch, V., Liu, L., Kallifatidis, G., Gross, W., ... Herr, I. (2012). Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by *Crambe crambe* marine sponge extract. *International Journal of Cancer*, 130(7), 1671-1681.

doi:10.1002/ijc.26168

Oztürk, B., de Jaeger, L., Smidt, H., & Sipkema, D. (2013). Culture-dependent and independent approaches for identifying novel halogenases encoded by *Crambe crambe* (marine sponge) microbiota. *Scientific Reports*, 3. doi:10.1038/srep02780

P

Patil, A. D., Freyer, A. J., Offen, P., Bean, M. F., & Johnson, R. K. (1997). Three New Tricyclic Guanidine Alkaloids from the Sponge *Batzella* sp. *Journal of Natural Products*, 60(7), 704-707. doi:10.1021/np970014r

Patil, A. D., Freyer, A. J., Taylor, P. B., Carté, Brad, Zuber, G., Johnson, R. K., & Faulkner, D. J. (1997). Batzelladines F–I, Novel Alkaloids from the Sponge *Batzella* sp.: Inducers of p56lck-CD4 Dissociation. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(6), 1814-1819. doi:10.1021/jo962084t

Patil, A. D., Kumar, N. V., Kokke, W. C., Bean, M. F., Freyer, A. J., Brosse, C. D., ... Carte, B. (1995). Novel Alkaloids from the Sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp120-Human CD4 Binding. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(5), 1182-1188. doi:10.1021/jo00110a021

Penesyan, A., Tebben, J., Lee, M., Thomas, J., & Kjelleberg, S. (2011). Identification of the antibacterial compound produced by the marine epiphytic bacterium pseudovibrio sp. D323 and related sponge-associated bacteria. *Marine Drugs*, 9, 1391-1402. doi : 10.3390/md9081391.

Pérez-Lopez, P., Ternon, E., González-García, S., Genta-Jouve, G., Feijoo, G., Thomas, O. P., & Moreira, M. T. (2014). Environmental solutions for the sustainable production of bioactive natural products from the marine sponge *Crambe crambe*. *Science of The Total Environment*, 475, 71-82. doi : 0.1016/j.scitotenv.2013.12.068.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002). Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 3094-3101. doi:10.1128/AEM.68.6.3094-3101.2002

Perru, O. (2006). Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. *Revue d'histoire des sciences*, Tome 59(1), 5-5. doi:10.3917/rhs.591.0005

Piel, J. (2009). Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, 26(3), 338-362. doi:10.1039/B703499G

Piel, J., Hui, D., Fusetani, N., & Matsunaga, S. (2004a). Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environmental Microbiology*, 6(9), 921-927. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00531.x

Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N., & Matsunaga, S. (2004b). Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16222-16227. doi:10.1073/pnas.0405976101

- Pile, A. J. (1997). Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 2. Sponge abundance, diet, feeding efficiency, and carbon flux. *Limnology and Oceanography*, 42(1), 178-184. doi :10.4319/lo.1997.42.1.0178
- Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3724-3730.
- Poppell, E., Weisz, J., Spicer, L., Massaro, A., Hill, A., & Hill, M. (2013). Sponge heterotrophic capacity and bacterial community structure in high- and low-microbial abundance sponges. *Marine Ecology*, 1-11. doi:10.1111/maec.12098
- Proksch, P. (1994). Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon*, 32(6), 639-655. doi:10.1016/0041-0101(94)90334-4
- Proksch, P., Edrada, R. A., & Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 125-134. doi:10.1007/s00253-002-1006-8
- Pulitzer-Finali, G. (1983). A collection of Mediterranean Demosponge (Porifera) with, in appendix, a list of Demospongiae recorded from the Mediterranean Sea. *Annali del Museo Civico di Storia Naturale*, 84, 445-621

Q

- Qian, P. Y., Dobretsov, S., Dahms, H. U., & Pawlik, J. (2006) Antifouling activity and microbial diversity of two congeneric sponges *Callyspongia* spp. From Hong Kong and the Bahamas. *Marine Ecology Progress Series*, 324, 151-165. doi : 10.3354/meps324151

R

- Rangel, M., de Sanctis, B., de Freitas, J. C., Moutinho Polatto, J., Granato, A. C., Berlinck, R. G. S., & Hajdu, E. (2001). Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(1), 31-40. doi:10.1016/S0022-0981(01)00276-3
- Rappé, M. S., Cannon, S. A., Vergin, K. L., & Giovannoni, S. J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 418(6898), 630-633. doi:10.1038/nature00917
- Reiswig, H. M. (1974) Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 14, 231-249. doi : 10.1016/0022-0981(74)90005-7
- Reiswig, H. M. (1975a). Bacteria as food for temperate-water marine sponges. *Canadian Journal of Zoology*, 53(5), 582-589. doi:10.1139/z75-072
- Reiswig, H. M. (1975b). The aquiferous systems of three marine demospongiae. *Journal of Morphology*, 145(4), 493-502. doi:10.1002/jmor.1051450407
- Reiswig, H. M. (1981). Partial Carbon and Energy Budgets of the Bacteriosponge *Verohgia fistularis* (Porifera: Demospongiae) in Barbados. *Marine Ecology*, 2(4), 273-293.

doi:10.1111/j.1439-0485.1981.tb00271.x

- Reveillaud, J., Maignien, L., Eren, A. M., Huber, J. A., Apprill, A., Sogin, M. L., & Vanreusel, A. (2014). Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *The ISME Journal*, 8(6), 1198-1209. doi:10.1038/ismej.2013.227
- Rosell, D., & Uriz, M. J. (1992). Do associated zooxanthellae and the nature of the substratum affect survival, attachment and growth of *Cliona viridis* (Porifera: Hadromerida)? An experimental approach. *Marine Biology*, 114(3), 503-507. doi:10.1007/BF00350042
- Roué, M., Domart-Coulon, I., Ereskovsky, A., Djebiat, C., Perez, T., & Bourguet-Kondracki, M. -L. (2010). Cellular localization of Clathridine, an antimicrobial 2-aminoimidazole alkaloids produced by the Mediterranean calcareous sponge *Clathrina clathrus*. *Journal of Natural Products*, 73(7), 1277-1282. doi : 10.1021/np100175x
- Roué, M., Quévrain, E., Domart-Coulon, I., & Bourguet-Kondracki, M. -L. (2012). Assessing calcareous sponges and their associated bacteria for the discovery of new bioactive natural products. *Natural Product Reports*, 29, 739-751.
- Rubiolo, J. A., Ternon, E., López-Alonso, H., Thomas, O. P., Vega, F. V., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2013). Crambescidin-816 Acts as a Fungicidal with More Potency than Crambescidin-800 and -830, Inducing Cell Cycle Arrest, Increased Cell Size and Apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Marine Drugs*, 11(11), 4419-4434. doi:10.3390/md11114419
- Rützler, K. (1988). Mangrove Sponge Disease Induced by Cyanobacterial Symbionts: Failure of a Primitive Immune System? *Disease of Aquatic Organisms*, 5, 143-149. doi:10.3354/dao005143.0
- Rützler, K. (1990) Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In : Rützler, K. (ed.) New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press, Washington DC, p 455-466
- Rurangirwa, F. R., Brayton, K. A., McGuire, T. C., Knowles, D. P., & Palmer, G. H. (2002). Conservation of the unique rickettsial rRNA gene arrangement in *Anaplasma*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), 1405-1409. doi:10.1099/ij.s.0.02145-0

S

- Sakai, R., Higa, T., Jefford, C. W., & Bernardinelli, G. (1986). Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society*, 108(20), 6404-6405. doi:10.1021/ja00280a055
- Saller, U. (1989). Microscopical aspects on symbiosis of *Spongilla lacustris* (Porifera, Spongillidae) and green algae. *Zoomorphology*, 108(5), 291-296. doi:10.1007/BF00312161
- Santavy, D. L., Willenz, P., & Colwell, R. R. (1990). Phenotypic study of bacteria associated with the caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1750-1762.
- Sarà, M. (1965). Associazioni fra Poriferi e alghe in acque superficiali del litorale marino.

- Instituto di Zoologie ed Anatomia Comparata – Università di Bari.
- Sarà, M., & Liaci, L. (1964). Symbiotic Association between Zooxanthellae and Two Marine Sponges of the Genus *Cliona*. *Nature*, 203(4942), 321-321. doi:10.1038/203321a0
- Saritas, M. U. (1972). A preliminary study on the silicious sponge (Porifera) fauna of Engeceli Limani in the Gulf of Ismir (Aegean Sea). *Scientific Reports of the Faculty of Science, Ege University*, 143, 17-18
- Schippers, K. J., Sipkema, D., Osinga, R., Smidt H., Pomponi, S. A., Martens, D. E., & Wijffels, R. H. (2012). Cultivation of sponges, sponge cells and symbionts : Achievements and future prospects. *Advances Marine Biology*, 62, 273-337. doi :10.1016/B978-0-12-394283-8.00006-0
- Schläppy, M.-L., Schöttner, S. I., Lavik, G., Kuypers, M. M. M., Beer, D. de, & Hoffmann, F. (2010). Evidence of nitrification and denitrification in high and low microbial abundance sponges. *Marine Biology*, 157(3), 593-602. doi:10.1007/s00227-009-1344-5
- Schmidt, O. (1862). *Die Spongien des Adriatischen Meeres*, Leipzig.
- Schmidt, E. W., Obraztsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., & Haygood, M. G. (2000). Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, « *Candidatus Enttheonella palauensis* ». *Marine Biology*, 136(6), 969-977. doi:10.1007/s002270000273
- Schmitt, S., Wehrl, M., Lindquist, N., Weisz, J. B., & Hentschel, U. (2007). Morphological and molecular analyses of microorganisms in Caribbean reef adult sponges and in corresponding reproductive material. *Porifera Research : Biodiversity, Innovation and Sustainability*, 561-568.
- Schmitt, S., Hentschel, U., & Taylor, M. W. (2012a). Deep sequencing reveals diversity and community structure of complex microbiota in five Mediterranean sponges. *Hydrobiologia*, 687(1), 341-351. doi:10.1007/s10750-011-0799-9
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., ... Taylor, M. W. (2012b). Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal*, 6(3), 564-576. doi:10.1038/ismej.2011.116
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., & Amann, R. (1997). Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3268-3273.
- Schöttner, S., Hoffmann, F., Cárdenas, P., Rapp, H. T., Boetius, A., & Ramette, A. (2013). Relationships between Host Phylogeny, Host Type and Bacterial Community Diversity in Cold-Water Coral Reef Sponges. *PLoS ONE*, 8(2), e55505. doi:10.1371/journal.pone.0055505
- Sciscioli, M., Lepore, E., Gherardi, M., & Scalera Liaci, L. (1994). Transfer of symbiotic bacteria in the mature oocyte of *Geodia cydonium* (Porifera, Demospongiae) : an ultrastructural study. *Cahiers de Biologie Marine*, 35(4), 471-478.

- Shigemori, H., Bae, M. A., Yazawa, K., Sasaki, T., & Kobayashi, J. (1992). Alteramide A, a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*. *The Journal of Organic Chemistry*, 57(15), 4317-4320. doi:10.1021/jo00041a053
- Siegl, A., Kamke, J., Hochmuth, T., Piel, J., Richter, M., Liang, C., ... Hentschel, U. (2011). Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *The ISME Journal*, 5(1), 61-70. doi:10.1038/ismej.2010.95
- Simister, R. L., Deines, P., Botté, E. S., Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2012a). Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14(2), 517-524. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02664.x
- Simister, R., Taylor, M. W., Rogers, K. M., Schupp, P. J., & Deines, P. (2013). Temporal molecular and isotopic analysis of active bacterial communities in two New Zealand sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(1), 195-205. doi:10.1111/1574-6941.12109
- Simmons, T. L., Coates, R. C., Clark, B. R., Engene, N., Gonzalez, D., Esquenazi, E., ... Gerwick, W. H. (2008). Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 4587-4594. doi:10.1073/pnas.0709851105
- Simpson, T. L. (1984). *The Cell Biology of Sponges*. New York : Springer-Verlag.
- Sipkema, D., Holmes, B., Nichols, S. A., & Blanch, H. W. (2009). Biological Characterisation of *Haliclona* (?gellius) sp.: Sponge and Associated Microorganisms. *Microbial Ecology*, 58(4), 903-920. doi:10.1007/s00248-009-9534-8
- Sipkema, D., Schippers, K., Maalcke, W. J., Yang, Y., Salim, S., & Blanch, H. W. (2011). Multiple Approaches To Enhance the Cultivability of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Haliclona* (gellius) sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2130-2140. doi:10.1128/AEM.01203-10
- Snider, B. B., & Shi, Z. (1992). Biomimetic synthesis of the bicyclic guanidine moieties of crambines A and B. *The Journal of Organic Chemistry*, 57(9), 2526-2528. doi:10.1021/jo00035a005
- Snider, B. B., & Shi, Z. (1993). Biomimetic synthesis of (.+-.)-crambines A, B, C1, and C2. Revision of the structure of crambines B and C1. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(15), 3828-3839. doi:10.1021/jo00067a014
- Snider, B. B., & Shi, Z. (1993). Biomimetic synthesis of the central tricyclic portion of ptilomycalin A. *Tetrahedron Letters*, 34(13), 2099-2102. doi:10.1016/S0040-4039(00)60355-6
- Staden, R. (1979). A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acids Research*, 6(7), 2601-2610. doi :10.1093/nar/6.7.2601
- Staley, J. T., Castenholz, R. W., Colwell, R. R., Holt, J. G., Kane, M. D., Pace, N. R... (1997). *The Microbial World : Foundation of the Biosphere*. The American Academy of Microbiology: Washington, DC.

- Steindler, L., Beer, S., & Ilan, M. (2002). Photosymbiosis in intertidal and subtidal tropical sponges. *Symbiosis*, 33(3), 263-273.
- Steinert, G., Whitfield, S., Taylor, M. W., Thoms, C., & Schupp, P. J. (2014). Application of diffusion growth chambers for the cultivation of marine sponge-associated bacteria. *Marine Biotechnology*, doi :10.1007/s10126-014-9575-y
- Stierle, A. C., Cardellina, J. H., 2nd, & Singleton, F. L. (1988). A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia*, 44(11-12), 1021. doi :10.1007/BF01939910
- Strupat, K., Karas, M., & Hillenkamp, F. (1991). 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 111, 89-102. doi:10.1016/0168-1176(91)85050-V
- Sun, W., Dai, S., Jiang, S., Wang, G., Liu, G., Wu, H., & Li, X. (2010). Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(1), 65-75. doi:10.1007/s10482-010-9430-8
- Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 625-630.
- Swan, B. K., Martinez-Garcia, M., Preston, C. M., Sczyrba, A., Woyke, T., Lamy, D., ... Stepanauskas, R. (2011). Potential for Chemolithoautotrophy Among Ubiquitous Bacteria Lineages in the Dark Ocean. *Science*, 333(6047), 1296-1300. doi:10.1126/science.1203690

T

- Tavares, R., Daloze, D., Braekman, J. C., Hajdu, E., & Van Soest, R. W. M. (1995). 8b-Hydroxyptilocaulin, a New Guanidine Alkaloid from the Sponge *Monanchora arbuscula*. *Journal of Natural Products*, 58(7), 1139-1142. doi:10.1021/np50121a029
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 295-347. doi:10.1128/MMBR.00040-06
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Baillie, H. J., Charlton, T. S., Nys, R. de, Kjelleberg, S., & Steinberg, P. D. (2004a). Evidence for Acyl Homoserine Lactone Signal Production in Bacteria Associated with Marine Sponges. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4387-4389. doi:10.1128/AEM.70.7.4387-4389.2004
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Dahllöf, I., Kjelleberg, S., & Steinberg, P. D. (2004b). Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 6(2), 121-130. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00545.x
- Taylor, M. W., Tsai, P., Simister, R. L., Deines, P., Botte, E., Ericson, G., ... Webster, N. S. (2013). 'Sponge-specific' bacteria are widespread (but rare) in diverse marine environments. *The ISME Journal*, 7(2), 438-443. doi:10.1038/ismej.2012.111

- Teeling, H., Meyerdierks, A., Bauer, M., Amann, R., & Glöckner, F. O. (2004). Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. *Environmental Microbiology*, 6(9), 938-947. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00624.x
- Thacker, R. W., & Starnes, S. (2003). Host specificity of the symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* in marine sponges, *Dysidea* spp. *Marine Biology*, 142(4), 643-648. doi:10.1007/s00227-002-0971-x
- Thakur, N. L., & Müller, W. E. G. (2004). Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*, 86(11), 1506-1512
- Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., & LokaBharathi, P. A. (2010b). Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review. *Marine Drugs*, 8(4), 1417-1468. doi:10.3390/md8041417
- Thomas, T., Rusch, D., DeMaere, M. Z., Yung, P. Y., Lewis, M., Halpern, A., ... Kjelleberg, S. (2010a). Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *The ISME Journal*, 4(12), 1557-1567. doi:10.1038/ismej.2010.74
- Thompson, J. E., Barrow, K. D., & Faulkner, D. J. (1983). Localization of Two Brominated Metabolites, Aerothionin and Homoaerothionin, in Spherulous Cells of the Marine Sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongia thiona*). *Acta Zoologica*, 64(4), 199-210. doi:10.1111/j.1463-6395.1983.tb00801.x
- Thoms, C., Horn, M., Wagner, M., Hentschel, U., & Proksch, P. (2003). Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Marine Biology*, 142(4), 685-692. doi:10.1007/s00227-002-1000-9
- Turon, X., Becerro, M. A., & Uriz, M. J. (2000). Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell and Tissue Research*, 301(2), 311-322. doi:10.1007/s004410000233
- Turon, X., Galera, J., & Uriz, M. J. (1997). Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *Journal of Experimental Zoology*, 278(1), 22-36. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19970501)278:1<22::AID-JEZ3>3.0.CO;2-8
- Turque, A. S., Cardoso, A. M., Silveira, C. B., Vieira, R. P., Freitas, F. A. D., Albano, R. M., ... Martins, O. B. (2008). Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, 155(2), 135-146. doi:10.1007/s00227-008-1008-x

U

- Unson, M. D., & Faulkner, D. J. (1993). Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia*, 49(4), 349-353. doi:10.1007/BF01923420
- Unson, M. D., Holland, N. D., & Faulkner, D. J. (1994). A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of

- the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology*, 119(1), 1-11. doi:10.1007/BF00350100
- Uriz, M. J., Agell, G., Blanquer, A., Turon, X., & Casamayor, E. O. (2012). Endosymbiotic Calcifying Bacteria: A New Cue to the Origin of Calcification in Metazoa? *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 66(10), 2993-2999. doi:10.1111/j.1558-5646.2012.01676.x
- Uriz, M. J., Becerro, M. A., Tur, J. M., & Turon, X. (1996). Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Marine Biology*, 124(4), 583-590. doi:10.1007/BF00351039
- Uriz, M. J., Martin, D., & Rosell, D. (1992). Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in Mediterranean littoral sponges. *Marine Biology*, 113(2), 287-297. doi:10.1007/BF00347283
- Uriz, M. J., Turon, X., & Becerro, M. A. (2001). Morphology and ultrastructure of the swimming larvae of *Crambe crambe* (Demospongiae, Poecilosclerida). *Invertebrate Biology*, 120(4), 295-307. doi:10.1111/j.1744-7410.2001.tb00039.x

V

- Vacelet, J., & Donadey, C. (1977). Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 30(3), 301-314. doi:10.1016/0022-0981(77)90038-7
- Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., ... Hooper, J. N. A. (2012). Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS ONE*, 7(4), e35105. doi:10.1371/journal.pone.0035105
- VanEtten, C. H., Nielsen, H. C., & Peters, J. E. (1965). A crystalline polypeptide from the seed of *Crambe abyssinica*. *Phytochemistry*, 4, 467-473. doi:10.1016/S0031-9422(00)86198-1
- Vicente, V. P. (1990). Response of sponges with autotrophic endosymbionts during the coral-bleaching episode in Puerto Rico. *Coral Reefs*, 8(4), 199-202. doi:10.1007/BF00265011
- Vogel, S. (1977). Current-induced flow through living sponges in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(5), 2069-2071.

W

- Webster, N. S., & Hill, R. T. (2001b). The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Marine Biology*, 138(4), 843-851. doi:10.1007/s002270000503
- Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental Microbiology*, 14(2), 335-346. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02460.x
- Webster, N. S., Cobb, R. E., & Negri, A. P. (2008). Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *The ISME Journal*, 2(8), 830-842.

doi:10.1038/ismej.2008.42

- Webster, N. S., Luter, H. M., Soo, R. M., Botte, E. S., Simister, R. L., Abdo, D., & Whalan, S. (2013). Same, same but different: symbiotic bacterial associations in GBR sponges. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00444
- Webster, N. S., Taylor, M. W., Behnam, F., Lückner, S., Rattei, T., Whalan, S., ... Wagner, M. (2010). Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environmental Microbiology*, 12(8), 2070-2082. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02065.x
- Webster, N. S., Webb, R. I., Ridd, M. J., Hill, R. T., & Negri, A. P. (2001a). The effects of copper on the microbial community of a coral reef sponge. *Environmental Microbiology*, 3(1), 19-31. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00155.x
- Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L., & Hill, R. T. (2001b). Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 434-444. doi:10.1128/AEM.67.1.434-444.2001
- Wehrl, M., Steinert, M., & Hentschel, U. (2007). Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microbial Ecology*, 53(2), 355-365. doi:10.1007/s00248-006-9090-4
- Weisz, J. B., Hentschel, U., Lindquist, N., & Martens, C. S. (2007). Linking abundance and diversity of sponge-associated microbial communities to metabolic differences in host sponges. *Marine Biology*, 152(2), 475-483. doi:10.1007/s00227-007-0708-y
- Weisz, J. B., Lindquist, N., & Martens, C. S. (2008). Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? *Oecologia*, 155(2), 367-376. doi:10.1007/s00442-007-0910-0
- Wichels, A., Würtz, S., Döpke, H., Schütt, C., & Gerdt, G. (2006). Bacterial diversity in the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* (Pallas). *FEMS Microbiology Ecology*, 56(1), 102-118. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00067.x
- Wilkinson, C. R. (1978a) Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology*, 49(2), 161-167. doi :10.1007/BF02010471
- Wilkinson, C. R. (1978b) Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Marine Biology*, 49(2), 169-176. doi :10.1007/BF00387116
- Wilkinson, C. R. (1978c) Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the in situ associations in coral reef sponges. *Marine Biology*, 49(2), 177-185. doi :10.1007/BF02010471
- Wilkinson C. R., & Garrone R. (1980) Nutrition in marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. In: Smith DC, Tixon Y (eds) Nutrition in the lower Metazoa. Pergamon Press, Oxford, pp 157±161
- Wilkinson, C. R. (1984). Immunological Evidence for the Precambrian Origin of Bacterial Symbioses in Marine Sponges. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 220(1221), 509-518. doi:10.1098/rspb.1984.0017

- Wilkinson, C. R. (1992) Symbiotic interactions between marine sponges and algae, p. 111-151. In W. Reisser (ed.), *Algae and symbiosis*. Biopress, Bristol, England.
- Wilkinson, C. R., Nowak, M., Austin, B., & Colwell, R. R. (1981). Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microbiol Ecology*, 7(1), 13-21. doi :10.1007/BF02010471
- Wörheide, D. G. (1998). The reef cave dwelling ultraconservative coralline demosponge *Astrosclera willeyana* Lister 1900 from the Indo-Pacific. *Facies*, 38(1), 1-88. doi:10.1007/BF02537358

Y

- Yarnold, J. E., Hamilton, B. R., Welsh, D. T., Pool, G. F., Venter, D. J., & Carroll, A. R. (2012). High resolution spatial mapping of brominated pyrrole-2-aminoimidazole alkaloids distributions in the marine sponge *Stylissa flabellata* via MALDI-mass spectrometry imaging. *Molecular BioSystems*, 8(9), 2249-2259. doi:10.1039/C2MB25152C
- Yooseph, S., Nealson, K. H., Rusch, D. B., McCrow, J. P., Dupont, C. L., Kim, M., ... Venter, J. C. (2010). Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature*, 468(7320), 60-66. doi:10.1038/nature09530

Résumé

Crambe crambe (Schmidt, 1862), espèce largement retrouvée en Méditerranée, est la source de nombreux alcaloïdes guanidiniques (crambescines et crambescidines). Les voies de biosynthèse de ces métabolites secondaires n'ont pas encore été démontrées. Il a cependant été proposé que les crambescidines seraient produites à partir de polycétides, suggérant ainsi la possible implication de micro-organismes dans leur biosynthèse. Cependant les quelques études portant sur la présence ou non de bactéries associées à cette éponge sont contradictoires. Durant cette thèse, nous avons caractérisé la communauté bactérienne associée à *C. crambe* par l'utilisation de techniques à la fois moléculaires et microscopiques, mettant en évidence l'association spécifique entre une bêtaprotéobactérie et cette éponge méditerranéenne. La présence d'un micro-organisme spécifique au sein du mésohyle de l'éponge pose alors la question du rôle de ce dernier au sein de son hôte et plus particulièrement sa possible implication dans la synthèse des alcaloïdes guanidiniques. L'étude de la diversité microbienne cultivable par la mise en place d'une procédure d'acclimatation et la conception de divers milieux de cultures, a permis l'isolement de micro-organismes minoritairement associés à *C. crambe*, mais n'a cependant pas conduit à l'isolement de la bêtaprotéobactérie spécifique. La comparaison des empreintes chimiques (CLHP/DAD/ELSD – CLHP/ESIMS) des extraits de l'éponge et des bactéries cultivées, a révélé que ces micro-organismes minoritaires n'étaient pas à eux seuls producteurs de ces métabolites bioactifs. La bactérie majoritaire, principale candidate dans la synthèse des métabolites n'étant pas cultivable, nous avons développé deux études complémentaires afin d'apporter des éléments de réflexion quant à sa possible implication. La culture *ex situ* de colonies *C. crambe* accompagnée d'un stress pH ainsi que l'étude de la distribution spatiale *in situ* des composés par imagerie par spectrométrie de masse se révèlent prometteuses bien qu'elles n'aient pas, à ce jour permis d'identifier le possible rôle de la bêtaprotéobactérie dans la biosynthèse de ces métabolites.

Mots clés : *Crambe crambe*/ bêtaprotéobactérie/ alcaloïdes guanidiniques pentacycliques/ pyroséquençage-454/ culture *ex situ*/ imagerie par spectrométrie MALDI-TOF

Abstract

Crambe crambe (Schmidt, 1862), is a marine sponge widely distributed in the Mediterranean Sea and known to produce bioactive guanidine alkaloids (crambescins and crambescidins). While the biosynthetic pathways of these metabolites remains unknown, bio-mimetic chemical synthesis of crambescidins suggested a possible contribution of microorganisms in their biosynthesis. Contrastingly, it had been reported via electron microscopy that bacteria were absent in the tissues of this sponge. Thus to shed light onto these contrasting results I studied the microbial community associated with *C. crambe* using alternative approaches. Using molecular and microscopic techniques, we demonstrated that a single bacterial species affiliated to the Betaproteobacteria is present in abundances commonly found in low microbial abundance sponges, and dominates the bacterial community associated with *C. crambe*. This finding suggests a possible implication of bacteria the biosynthesis of *C. crambe*'s guanidine alkaloids. The use of acclimatization procedure and diverse cultivation approaches allowed the isolation of associated microorganisms which were rare or absent among the community described via tag pyrosequencing but not isolation of the dominant betaproteobacterium. CLHP/DAD/ELSD and CLHP/ESIMS fingerprints of extracts from *C. crambe* and from the isolated bacteria showed no evidence of the implication of these cultured micro-organismes in the synthesis of *C. crambe*'s metabolites. Finally in order to evaluate the potential role of the uncultivated betaproteobacterial symbiont in the biosynthesis of guanidinium alkaloids, preliminary experiments using two alternative approaches were attempted. In the first I subjected sponges to a pH stress and evaluated changes in secondary metabolite profiles, while collecting samples for microbial community analysis. In the second I tried different mass spectrometry imaging techniques to localize guanidinium alkaloids in *C. crambe* tissues. While these experiments did not allow to resolve the question of a possible implication of the dominant betaproteobacterium in the biosynthesis of the pentacyclic guanidine alkaloids, I was able to gather interesting results that will guide future studies towards resolving this question.

Keywords: *Crambe crambe*/ betaproteobacteria/ pentacyclic guanidine alkaloids/ 454-pyrosequencing/ *ex situ* culture/ mass spectrometry imaging MALDI-TOF

